

Design und Synthese selektiver Inhibitoren *splicing*-regulierender Kinasen der CLK-Familie

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Anne Walter
aus Wolfenbüttel

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
3. Referent:	Professor Dr. Michael Müller
eingereicht am:	03.06.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am:	24.11.15

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Walter, A., Helmer, R., Loaëc, N., Villers, B., Preu, L., Meijer, L., Kunick, C.: 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-ones as selective inhibitors of CDC2-like kinases (CLKs). (Poster) 248. ACS National Meeting, San Francisco (2014).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2012 bis Juni 2015 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung und die Unterstützung in der Verwirklichung von Projekten abseits der zentralen Thematik sowie die schöne Zeit in seinem Arbeitskreis besonders herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Co-Referats.

„Auf der Erkenntnis beruht die Freiheit.“

ERNST FREIHERR VON FEUCHTERSLEBEN

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Alternatives <i>splicing</i> und dessen Relevanz für den menschlichen Organismus	1
1.2 Kinasen mit regulatorischer Funktion im <i>splicing</i> -Prozess.....	3
CDC2-like Kinases (CLKs)	3
Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinases (DYRKs).....	11
Serine Arginine-rich Protein Kinases (SRPKs)	14
1.3 Indirubin als Kinaseinhibitor	18
Ursprung und biologische Aktivität	18
Strukturelle Ableitung der Mini-Indirubine	18
2 Zielsetzung.....	20
2.1 Design und Synthese neuer CLK-Inhibitoren.....	20
2.2 Virtuelles Screening	21
3 Molekulares <i>docking</i>	22
3.1 Rationales Design neuer 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one 17	23
Bindemodi co-kristallisierter Inhibitoren in CLK1	32
Vergleich der Bindungsmodi in verschiedenen CLK-Isoformen	34
<i>Docking</i> -Studien an DYRK-Kinasen zur Erklärung der Inhibitor-Selektivität	37
Fazit der <i>docking</i> -Studien	40
4 Synthese	41
4.1 Synthese von 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid und Derivaten (25)..	41
4.2 Versuche zur Synthese von Phenylacetaldehyden (27)	43
2-Iodoxybenzoesäure (IBX)	44
Pyridiniumchlorochromat.....	45

	Natriumhypochlorit und 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO).....	47
4.3	Synthese der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one 17	48
	Fischer-Indol-Reaktion mit Phenylacetaldehyden.....	48
	Fischer-Indol-Reaktion mit Phenylacetaldehyddimethylacetal.....	52
	Fischer-Indol-Reaktion mit <i>in situ</i> Aldehyd-Synthese.....	54
	Demethylierung von 3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-on 17i	55
	Acetylierung des Phenols 17l	56
	Reduktion von 3-(3-Nitrophenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-on 17j	58
4.4	Versuche zur Synthese von 3-Alkyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-onen	59
4.5	Synthese <i>N</i> -substituierter 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one 22	62
4.6	Synthese 5-substituierter 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one 21a-e	64
4.7	Synthese von 2-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-on 54	66
4.8	Synthese von 3-Aryl-1 <i>H</i> -indol-7-carboxamiden 19	67
4.9	Synthese der 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4- <i>a</i>]carbazol-7-carbonsäure 60 und des Methylamids 61	71
4.10	Versuch zur Synthese von 1-Oxo-1,2,3,10-tetrahydropyrrolo[3,4- <i>a</i>]carbazol-7-carbonsäure 62	73
5	Virtuelles Screening	74
5.1	<i>fingerprint</i> -Suche	76
5.2	Pharmakophor-Suche	80
5.3	Molekulares <i>docking</i>	83
5.4	Biologische Evaluation ausgewählter Screening-Substanzen	84
6	Erstellung von Inhibitor-Protein-Co-Kristallstrukturen	90
6.1	Röntgenkristallstruktur von CLK1 mit 17l	90

6.2	Röntgenkristallstruktur von CLK1 mit 54	95
6.3	Röntgenkristallstruktur von CLK3 mit 17a	97
7	Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen	100
7.1	Struktur-Wirkungsbeziehungen der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one.....	100
	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Verbindungen 60 und 61	108
7.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen der 3-Phenyl-1 <i>H</i> -indol-7-carboxamide	109
7.3	Differentielle Scanning Fluorimetrie	113
	DSF-Analyse der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4- <i>g</i>]indol-8(1 <i>H</i>)-one	113
	DSF-Analyse der Screening-Hits 20a-e	115
	DSF-Analyse der 3-Phenyl-1 <i>H</i> -indol-7-carboxamids 19h	116
8	Zusammenfassung	118
8.1	Synthese neuer CLK-Inhibitoren.....	118
8.2	Virtuelles Screening.....	119
9	Summary	120
9.1	Synthesis of novel CLK inhibitors.....	120
9.2	Virtual screening.....	121
10	Experimenteller Teil	122
10.1	Geräte und Methoden.....	122
10.2	Synthesen und analytische Daten	126
	Anhang zu Abschnitt 10.2: Gefahrstoffverzeichnis	189
10.3	Virtuelles Screening.....	194
	<i>fingerprint</i> -Suche	194
	Pharmakophor-Suche	197
10.4	Molekulares <i>docking</i>	197
10.5	Proteinkristallographie	199
10.6	Verfahren zur Testung der biologischen Aktivität.....	214

	<i>In vitro</i> -Bestimmung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität.....	214
10.7	Differentielle Scanning Fluorimetrie	217
	Proteinexpression und -reinigung	217
10.8	Anhang: Tabellen mit biologischen Daten	221
11	Literaturverzeichnis.....	232

Abkürzungsverzeichnis

4-DMAP:	4-Dimethylaminopyridin
ABL:	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ALK:	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
APP:	<i>amyloid precursor protein</i>
Boc-Schutzgruppe:	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
CDC2:	<i>cell division control 2</i> = CDK1
Ci:	Curie
CMGC:	CDK, MAPK, GSK3, CLK
DBH:	Debromohymenialdisin
DDQ:	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DIPEA:	Diisopropylethylamin
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
DRB:	5,6-Dichlor-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol
DSF:	Differentielle Scanning Fluorimetrie
DTT:	Dithiothreitol
ECFP:	<i>extended-connectivity fingerprint</i>
EDA:	Extradomäne A
FasL:	Fas Ligand
FCFP:	<i>functional-class fingerprint</i>
<i>gk</i> :	<i>gatekeeper</i>
GOLD:	<i>genetic optimisation for ligand docking</i>
HCV:	Hepatitis C Virus
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV:	Humanes Immundefizienz Virus
IPTG:	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_d :	Dissoziationskonstante (Ligand/Proteinbindung)
MOE:	<i>molecular operating environment</i>
<i>m</i> RNA:	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
NMR:	<i>nuclear magnetic resonance</i> (kernmagnetische Resonanz)
PDB:	<i>protein data bank</i>
PEI:	Polyethylenimin

Pf:	<i>Plasmodium falciparum</i>
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PyBOP:	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
rpm:	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT:	Raumtemperatur
rtPCR:	<i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SGC:	<i>Structural Genomics Consortium</i>
SMILES:	<i>simplified molecular input line entry specification</i>
snRNP:	<i>small nuclear</i> Ribonucleoprotein
TCEP:	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEV:	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA:	Trifluoressigsäure
Trp:	Tropfen
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

Obwohl die Therapiemöglichkeiten bei einer Vielzahl von Erkrankungen insbesondere im letzten Jahrhundert enorm zugenommen haben, besteht dennoch weiterhin Bedarf an der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Bis heute existieren Krankheiten, die nicht oder nur unzureichend behandelt werden können, so z.B. Morbus Alzheimer und diverse Tumorleiden.¹ Für die Entwicklung innovativer Medikamente bieten sich Prozesse im menschlichen Organismus an, deren Relevanz in der Pathogenese spezifischer Erkrankungen diskutiert wird, für die es jedoch bisher keine Arzneistoffe auf dem Markt gibt, die an Zielstrukturen dieser Systeme wirksam sind. Um einen derartigen Prozess handelt es sich z.B. bei dem Vorgang des posttranskriptionalen alternativen *splicings* von *mRNA*.

1.1 Alternatives *splicing* und dessen Relevanz für den menschlichen Organismus

Im Rahmen der Proteinbiosynthese wird der in den Kernen eukaryotischer Zellen als DNA gespeicherte genetische Code ausgelesen. Über mehrere Schritte werden, basierend auf den in der DNA enthaltenen Informationen, Proteine gebildet, welche die Funktionsfähigkeit der Zelle gewährleisten. Während der Transkription der DNA im Zellkern wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase zunächst die sogenannte prä-*mRNA* gebildet, die sich aus Exons und Introns zusammensetzt. Als Exons werden solche Bereiche der *mRNA* bezeichnet, welche cytosolisch an den Ribosomen in die entsprechende Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins translatiert werden. Intronsequenzen hingegen werden zuvor entfernt. Das Herausschneiden der Introns und die Wiederverknüpfung der verbleibenden Exons wird durch einen Proteinkomplex katalysiert, welcher als Spliceosom (*to splice sth.* = etw. zusammenfügen) bezeichnet wird und aus *snRNPs* (*small nuclear* Ribonucleoprotein) sowie weiteren Proteinen besteht. In Abhängigkeit regulatorischer Faktoren können sich die Bereiche der Exons und Introns auf der prä-*mRNA* verschieben, wodurch verschiedene Varianten der gebildeten *mRNA* eines Gens möglich werden. Letztlich können so unterschiedliche Isoformen eines Proteins aus der gleichen DNA-Sequenz entstehen, wodurch die Vielfalt der gewebespezifischen Proteinexpression bei gleichbleibender Anzahl der Gene erhöht wird. Für 90% der Gene im menschlichen Organismus, die mehrere Exons enthalten, wird angenommen, dass verschiedene Splicevarianten der *mRNA* existieren.^{2, 3}

Als wichtige Regulatoren des *splicings* werden *cis*-Elemente beschrieben, bei denen es sich um Sequenzen in der prä-*mRNA* handelt, die *splicing*-Faktoren binden, wodurch die Rekrutierung des Spliceosoms begünstigt oder verhindert werden kann. Insbesondere bei höheren Eukaryoten wird durch die Anordnung und geringe Konservierung der *cis*-Elemente das alternative *splicing* in größerem Ausmaß ermöglicht. Um die Anlagerung von *snRNA*-Fragmenten, die die Grenzen der Introns definieren, trotz verminderter Übereinstimmung der Basenpaare zu gewährleisten, sind SR-Proteine von Bedeutung. Diese *splicing*-Faktoren enthalten Struktur motive für die Bindung von RNA und stabilisieren RNA-Doppelstränge nach Anlagerung.⁴ Ihr Name leitet sich von einem charakteristischen Strukturmotiv ab, welches aus einer Serin (S)- und Arginin (R)-reichen Region besteht, in der Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen (z.B. CLKs) möglich sind. Der Grad der Phosphorylierung beeinflusst die Lokalisation der SR-Proteine innerhalb der Zelle und damit ihren regulatorische Einfluss auf das *splicing*, welches im Zellkern stattfindet.⁵

Während der Entwicklung und Zelldifferenzierung wurde, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, häufig eine Veränderung des Exon-Gebrauchs beobachtet. Unter anderem üben externe Faktoren, wie Rezeptorsignale oder zellulärer Stress einen Einfluss aus, welcher die Anpassung der Proteinexpression an den jeweiligen Bedarf erlaubt. Die Modifikation der Aminosäuresequenz durch alternatives *splicing* kann sowohl zu einer Funktionsänderung des betroffenen Proteins führen als auch den vollständigen Verlust der Funktion bedeuten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass entstehende Proteinisoformen unterschiedliche Affinitäten zu niedermolekularen Liganden oder Makromolekülen aufweisen können, sowie voneinander verschiedene Zelllokalisationen oder Stabilitäten aufweisen können.⁶ Ein Beispiel hierfür ist das *splicing* der *mRNA* des Tau-Proteins, dessen Isoformen sich in der Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli unterscheiden. Bei Fehlregulation kann es zur Entstehung von Krankheiten wie frontotemporaler Demenz kommen.⁷ In anderen Fällen ist auf Grund frühzeitig auftretender Stop-Codons auch ein Abbau der *mRNA* bereits vor der Translation möglich (NMD = *nonsense mediated decay*), sodass die entsprechenden Proteine nicht gebildet werden.

Die zahlreichen Einflussfaktoren machen deutlich, dass es sich bei dem Prozess des *splicings* von prä-*mRNA* um einen stark regulierten Vorgang handelt, dessen korrekter Ablauf entscheidend für einen gesunden Organismus ist. Auftretende Fehlregulationen können

dagegen das Entstehen von Krankheiten begünstigen, weshalb an diesem Prozess beteiligte Komponenten, wie beispielsweise Kinasen, Targets für neue Arzneistoffe darstellen, die bisher noch nicht erschlossen wurden.

1.2 Kinasen mit regulatorischer Funktion im *splicing*-Prozess

CDC2-like Kinasen (CLKs)

Die Familie der humanen *CDC2-like kinases* (CLKs) gehört zu den Serin/Threonin-Kinasen und setzt sich aus vier Mitgliedern (CLK1-4) zusammen, die der Gruppe der CMGC Kinasen zugeordnet werden können. CLKs sind Kinasen mit dualer Spezifität, d.h., dass sie neben Serin- und Threonin-Resten zusätzlich Tyrosin-Reste in einer Autophosphorylierungsreaktion modifizieren können. Substrate werden hingegen nicht an Tyrosin phosphoryliert. Es wird angenommen, dass der eigene Phosphorylierungsstatus Einfluss auf die intranukleäre Lokalisation und Funktion der Kinasen hat.⁸

Aufbau

Dem allgemeinen Aufbau von Proteinkinasen folgend, können die CLKs in eine *N*-terminale Domäne, hauptsächlich bestehend aus β -Faltblättern, und eine *C*-terminale Domäne, geprägt von α -Helices, gegliedert werden. Beide Domänen sind über die *hinge*-Region miteinander verbunden, welche gleichzeitig durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken eine wichtige Rolle in der Bindung von ATP spielt (Abbildung 1).

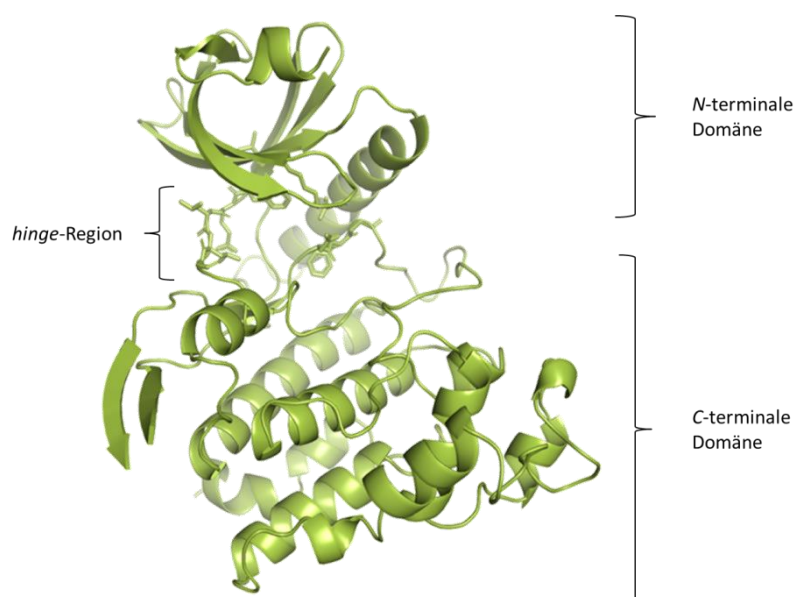


Abbildung 1: Gesamtansicht der CLK1 (PDB: 1Z57) mit Kennzeichnung der übergeordneten Strukturelemente.⁹

Als Lieferant des durch die Kinasen übertragenen Phosphat-Restes wird ATP in einer Bindetasche angelagert, die sich zwischen der N- und C-terminalen Domäne befindet und durch die *hinge*-Region seitlich begrenzt wird. Die Substratbindestelle liegt hingegen in der C-terminalen Domäne, die unter anderem durch die konservierte Aminosäuresequenz EHLAMMERILG charakterisiert wird und als Namensgeber für Kinasen dient, die dieses Motiv enthalten (sog. LAMMER-Kinasen).¹⁰

Von besonderer Bedeutung für die Bindung niedermolekularer, ATP-kompetitiver Kinaseinhibitoren ist die ATP-Bindetasche, aus der dieses durch den Inhibitor verdrängt wird. Innerhalb dieser Kavität lassen sich Bereiche mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften voneinander unterscheiden, die in einem Großteil der Kinasen wiederzufinden sind. Abbildung 2 zeigt die ATP-Bindetasche der CLK1, welche mit Phenylalanin (Phe241) einen voluminösen lipophilen *gatekeeper* als erste Aminosäure der *hinge*-Region aufweist. Für die Interaktion des ATPs mit der Kinase sind die in Richtung des C-Terminus folgenden Aminosäuren Glu242 (gk+1) und Leu244 (gk+3) von Bedeutung, da Wasserstoffbrücken zwischen dem Proteinrückgrat und dem Adenin-Teil des ATP-Moleküls ausgebildet werden. Auch von Kinaseinhibitoren wird dieses Interaktionsmotiv häufig genutzt. Die Bezeichnung *gatekeeper*-Aminosäure leitet sich von der Tatsache ab, dass die Seitenkette dieser Aminosäure den Eingang zu einer Tasche im hinteren Bereich der ATP-Bindetasche verschließt. Ändert sich die Konformation dieser Seitenkette, so können zusätzliche Interaktionsmöglichkeiten entstehen. Allerdings war dies in den bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der CLK-Kinasen nicht zu beobachten, deren ATP-Bindetasche, auch durch den voluminösen *gatekeeper* (Ph241) bedingt, vergleichsweise klein ausfällt.

Am Boden der Bindetasche befindet sich in den Isoformen CLK1, CLK2 und CLK4 jeweils ein lipophiler Valin-Rest (Val225), welcher in der CLK3 gegen ein Alanin (Ala319) ausgetauscht ist. Zusammen mit dem Austausch von Asp250 in CLK1 gegen Glu245 in CLK3 in der α -Helix am Eingang der Bindetasche handelt es sich um die einzigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Bindetaschen zwischen den Isoformen CLK1-4.

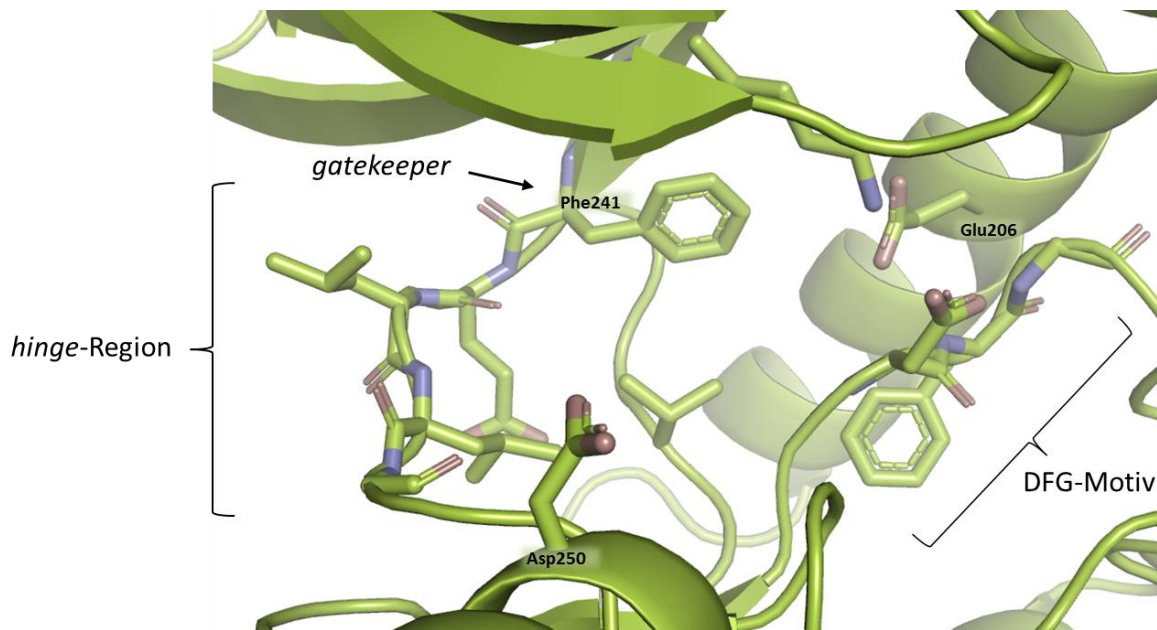


Abbildung 2: ATP-Bindetasche der CLK1 (PDB: 1Z57) mit Kennzeichnung wichtiger Strukturelemente.

Im Allgemeinen handelt es sich bei der ATP-Bindestelle in Kinasen um eine hoch konservierte Region, außerhalb dieser Bindestelle sind jedoch deutliche Unterschiede bemerkbar. Die Sequenzhomologie zwischen CLK3 und den übrigen CLK-Isoformen ist im gegenseitigen Vergleich insgesamt am geringsten (48% ggü. CLK1), was sich auch in einer veränderten Substratspezifität bemerkbar macht. Zusätzlich zu dem Aminosäureaustausch in der ATP-Bindetasche ist zu vermuten, dass eine durch weitere Sequenzunterschiede bedingte Konformationsänderung, die indirekt auf die Bindetasche wirkt, zu den beobachteten Differenzen in der Inhibitoraktivität beiträgt. Hingegen sind sich CLK1 und CLK4 mit einer Sequenzhomologie von 78% sowohl strukturell als auch in ihrem Bindungsverhalten von Inhibitoren besonders ähnlich.⁹ Ein weiteres konserviertes Element, welches für den katalytischen Mechanismus der Kinasen von Bedeutung ist, stellt eine Salzbrücke dar, die die Bindetasche am rechten Rand begrenzt. Im Fall der CLK1 wird diese zwischen Glu206 der α C-Helix und Lys191 des β 3-Faltblatts ausgebildet. Das ebenfalls am katalytischen Mechanismus beteiligte DFG-Motiv befindet sich in unmittelbarer Nähe als Teil der Aktivierungsschleife (*activation loop*). Es sorgt über die Bindung eines Magnesium-Ions für die korrekte Positionierung des ATP- γ -Phosphat-Restes. In Abbildung 2 ist die Kinase in ihrer katalytisch aktiven Form dargestellt, in der sich das DFG-Motiv in der sogenannten *DFG-in* Konformation befindet, d.h., dass die Seitenkette des Phenylalanins in Richtung der α C-Helix ausgerichtet ist. Für CLKs wurde die inaktive *DFG-out* Konformation, in der ein zusätzlicher Bereich zur Bindung von Inhibitoren zur Verfügung steht, bisher nicht beschrieben. Grundsätzlich haben

Inhibitoren, die an die inaktive Konformation der Kinase binden (Typ II-Inhibitoren), meist einen Selektivitätsvorteil, da sich die Bindungseigenschaften der Kinasen in dieser Konformation stärker voneinander unterscheiden als dies in der aktiven Konformation der Fall ist.¹¹ Ein Beispiel für einen Inhibitor dieses Typs ist der ABL-Kinase-Inhibitor Imatinib, welcher zur Therapie von chronisch-myeloischer Leukämie in Deutschland als Glivec im Handel ist.¹² Dagegen führt die Bindung von Inhibitoren an die aktive Form einer Kinase zu einer verminderten Ausbildung von Resistenzen.¹¹

Rolle der CLK1 in der Pathogenese *splicing*-abhängiger Erkrankungen

Wie zuvor bereits beschrieben, sind die CLKs an der Regulation des alternativen *splicings* durch Phosphorylierung von *splicing*-Faktoren beteiligt. In Folge erhöhter oder verminderter Kinaseaktivität kann es demnach zu Fehlregulationen kommen, welche wiederum die Entstehung von Krankheiten begünstigen.

Die Ablagerung von Tau-Protein-haltigen neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, *NFT*) im Gehirn von Demenz-Patienten wird mit der Entstehung der Erkrankung in Zusammenhang gebracht. STAMM *et al.* konnten zeigen, dass sich die Neigung zur Präzipitation in Abhängigkeit von der Isoform des Tau-Proteins dadurch verändert, dass die Anzahl an C-terminalen Bindedomänen für Mikrotubuli unterschiedlich ist. In adulten menschlichen Zellen wird das Verhältnis der Isoformen 3R und 4R (d.h. drei bzw. vier Bindestellen) durch alternatives *splicen* von Exon 10 der Tau-prä-mRNA reguliert, wobei dieses Exon nur in der 4R-Isoform enthalten ist.¹³ Zur Bindung von *splicing*-Regulatoren enthält Exon 10 zwei *enhancer* (Verstärker)- und zwei *silencer*-Domänen. SR-Proteine (SRp30c, SRp55, SRp75), 9G8, U2AF, PTB und hnRNP G hemmen durch Bindung an die *Silencer*-Domänen den Einbau von Exon 10, wohingegen hTRA2-beta1, CELF3 und CELF4 den Einbau fördern. Die Kinasen der CLK-Familie beeinflussen das Gleichgewicht zwischen den Isoformen, indem sie die Aktivität der als *splicing*-Faktoren wirkenden SR-Proteine durch Phosphorylierung modifizieren. Eine Hyperphosphorylierung führt zur Freisetzung der SR-Proteine aus ihren intranukleären Speicherorten, den *nuclear speckles*, und zur Wanderung an den Ort der Transkription. Dort nehmen sie durch Bindung an das Spliceosom Einfluss auf den *splicing*-Prozess. Bevor sich die Bindung wieder lösen kann und eine Regeneration der SR-Proteine stattfindet, muss es zuvor wiederum zu einer Dephosphorylierung durch Phosphatasen kommen.¹⁴ Bei vorhandener CLK-Aktivität sinkt der Anteil der 4R-Isoform des Exon 10 im

Tau-Protein, insbesondere durch CLK2 und CLK3, bei CLK1 und CLK4 hingegen fällt der Effekt etwas geringer aus.¹⁵ Auch für GSK3 β wird das Phosphorylieren von *splicing*-Faktoren beschrieben, die für die Regulation des Exon 10-Gebrauchs relevant sind. Neben der frontotemporalen Demenz, welche durch neurofibrilläre Bündel bedingt ist, gelten NFTs auch als Kennzeichen anderer sogenannter Tauopathien wie zum Beispiel bestimmter Arten von Parkinson und progressiver supranukleärer Blickparese.¹³ CLK-Inhibitoren können als biochemische Werkzeuge in der zukünftigen Erforschung der Rolle der CLKs in der Pathogenese dieser Krankheiten von Nutzen sein.

Das ovariale Karzinom ist eine weitere Erkrankung, an deren Pathogenese verändertes *splicing* beteiligt ist. Auf die Regulation der Zellproliferation und -migration, sowie auf die Invasion gesunden Gewebes durch Krebszellen wirkt sich unter anderem die Aktivität des *splicing*-Faktors SPF45 aus, dessen Überexpression die genannten Prozesse begünstigt. SPF45 steuert das *splicing* von Exon 6 des Fas-Rezeptors, welches für die Transmembrandomäne kodiert. Der Fas-Rezeptor ist ein TNF-Rezeptor, durch den nach Bindung des Liganden (FasL) über mehrere Schritte Apoptose induziert werden kann. Wird Exon 6 nicht in die mRNA des Rezeptors eingebaut, entsteht dagegen eine lösliche Rezeptorvariante, die nicht Teil der Apoptose-Signalkaskade ist.¹⁶ In verschiedenen Tumorarten, wie beispielsweise in Brustkrebszellen und in Gebärmutterkrebszellen, wurde eine erhöhte Expression von SPF45 beobachtet, die durch geringeren Einbau von Exon 6 zu einer verminderten Apoptosefähigkeit der Zellen führt. Eine weitere Folge der Überexpression von SPF45 ist, dass auch die Fibronectin-Expression (EDA-haltige Variante) steigt, wodurch vorhandene vielzellige Sphäroide aus ovariellen Krebszellen an Kompaktheit gewinnen, sodass die Invasivität des Tumors steigt.¹⁷ Zusätzlich ist die Resistenzentwicklung innerhalb dieser Zellansammlungen im Vergleich zu einzelnen Tumorzellen häufig begünstigt und die Chemotherapie damit erschwert.¹⁸ Neben den bereits genannten Faktoren führt auch Cortactin, ein Actin regulierendes Protein, in seiner durch SPF45 vermehrt exprimierten Wildtyp-Variante zu gesteigerter Tumorzellenmigration und -invasion. EBLEN *et al.* zeigten, dass die beschriebenen Effekte, die SPF45 auf das *splicing* und damit auf die Tumorentwicklung hat, abhängig von der Phosphorylierung durch CLK1 an acht spezifischen Serin-Resten des *splicing*-Faktors sind. Während die verstärkte Aktivität der Kinase zur Erhöhung der SPF45-Expression führte, wurde durch CLK1-Inhibition der Abbau in Proteasomen gefördert.¹⁹ Die Hemmung von CLK1

resultiert demnach indirekt in einer Minderung der Tumorzellenmigration und der Invasivität.

Auf Grund der regulierenden Funktionen, die CLKs im Prozess des alternativen *splicings* einnehmen, beeinflussen sie, wie beschrieben, auf indirektem Weg auch die Pathogenese *splicing*-abhängiger Erkrankungen. Folglich könnte die Erschließung dieser Kinasen als Zielstruktur für neue Arzneistoffe zusätzliche Therapieoptionen für bisher nicht adäquat behandelbare Krankheiten eröffnen. Potente und selektive Inhibitoren der CLKs können hierbei als Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung dieser Kinase-Familie als geeignetes Target dienen.

Nichthumane Isoformen der CLK1

Homologe der humanen CLKs sind auch in weiteren Organismen unterschiedlicher Klassen vorhanden, so wurden beispielsweise in verschiedenen Protozoen Isoformen der CLKs entdeckt. PRADEL *et al.* führten Untersuchungen an *PfCLK1* und *PfCLK2* aus *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*, durch und konnten zeigen, dass diese essentiell für den parasitären Lebenszyklus sind. *PfCLKs* wurden sowohl in den Zellkernen als auch im Cytosol mehrerer im menschlichen Wirt auftretender Entwicklungsstufen des Parasiten gefunden. In reversen Genetik-Experimenten an der asexuellen Form des Parasiten war der Versuch, *PfCLK knock-out* Mutanten zu generieren, erfolglos, wodurch deutlich wird, dass diese Kinasen für die Lebensfähigkeit der Plasmodien benötigt werden.²⁰ Die Entwicklung selektiv plasmodial wirkender *PfCLK*-Inhibitoren würde somit eine weitere Therapieoption in Form einer neuen Arzneistoffklasse für Malaria-Erkrankte bedeuten, was besonders vor dem Hintergrund steigender Resistenzen der Erreger von Bedeutung ist.^{21, 22}

Weiterhin sind sowohl in Hefen als auch in Vögeln, Mäusen und Insekten CLKs als Teil des Kinoms enthalten und wurden bereits zur Erforschung der biologischen Funktionen dieser Proteinkinase-Familie genutzt.²³⁻²⁵

CLK-Inhibitoren: Potenz und Selektivität

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es eine kleinere Anzahl strukturell verschiedener Inhibitoren der CLK-Familie. DRB (5,6-Dichlor-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol) **1**, welches als Hemmstoff der Transkription bekannt wurde, wirkt ebenfalls als Inhibitor von Proteinkinasen und stellte den ersten Hemmstoff der murinen CLK2 dar, der durch Inhibition der Tyrosin-

Autophosphorylierung die Aktivität der Kinase modifiziert.⁸ Die später von HAGIWARA *et al.* synthetisierten Benzothiazol-Derivate gehörten jedoch zu den ersten als CLK-Inhibitoren entwickelten Substanzen, die auch eine gewisse Selektivität für CLKs aufwiesen (Abbildung 3). Tests an isolierten Enzymen aus der Maus zeigten zum Teil Aktivitäten der Verbindungen im niedrig nanomolaren Bereich.

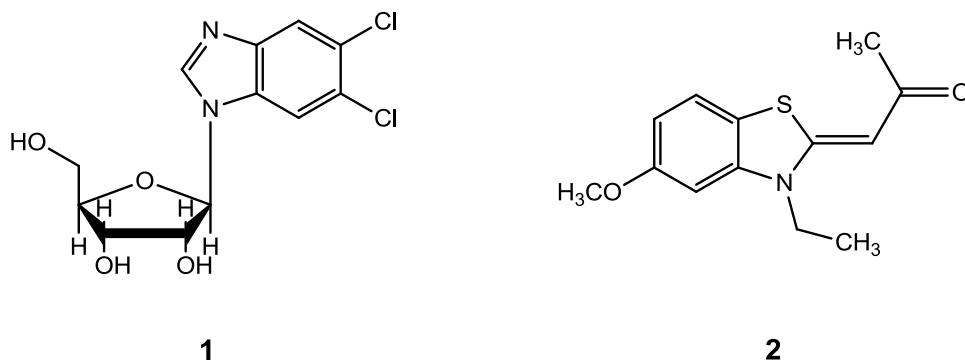


Abbildung 3: Transkriptions - und Kinaseinhibitor DRB **1** und CMGC-Kinaseinhibitor TG003 **2**.

TG003 **2** hat sich zu dem bedeutendsten Vertreter der Klasse entwickelt. Da die Substanz besonders starke Inhibition auch an der humanen CLK1 und CLK4 zeigte (K_d : 0.019 μM und 0.030 μM), wurde sie häufig als Modellsubstanz im Rahmen von Studien zur biologischen Funktion der Kinasen verwendet. In Untersuchungen bezüglich des Effekts von SPF45 auf das *splicing* von Fas-prä-mRNA (s.o.) wurde die Verbindung eingesetzt um die Abhängigkeit des Prozesses von der Phosphorylierung durch CLK1 zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass in COS-1 Zellen (fibroblasten-ähnliche Zellen aus Nierengewebe von Primaten) sowohl die genetisch modifizierte, inaktive CLK1-Mutante als auch die Zugabe von TG003 die Reduktion des Einbaus von Exon 6 in die Fas-mRNA verhindert haben. Durch dieses Experiment wurde zum einen die Wirkung des Benzothiazol-Derivats auf CLK1 bestätigt und zum anderen die Relevanz dieser Kinase für die Regulation des alternativen *splicings* bewiesen.¹⁹ Allerdings muss, nach Betrachtung des Selektivitätsprofils der Substanz, berücksichtigt werden, dass der beobachtete Effekt auf die Inhibition mehrerer Kinasen zurückzuführen sein könnte. Innerhalb der CLK-Familie fällt auf, dass die Aktivität von **2** an CLK3 vergleichsweise gering ist, jedoch alle übrigen Vertreter im niedrig nanomolaren Bereich inhibiert werden. Diese Tendenz lässt sich grundsätzlich bei einem Großteil der CLK Inhibitoren beobachten und ist vermutlich auf die oben beschriebenen strukturellen Unterschiede der Proteinisoformen zurückzuführen. An Hand eines breiten Selektivitätstests an 402 Kinasen wurde weiterhin

gezeigt, dass sich die Affinität von TG003 **2** nicht auf CLKs beschränkt, sondern dass es sich bei der Verbindung ebenfalls um einen potenten DYRK1A-Inhibitor handelt und auch Kinasen außerhalb der CMGC Gruppe, wie beispielsweise PIM1 der CAMK-Gruppe, gehemmt werden.^{26, 27}

Mit den 6-Arylchinolin-4-aminen wurde von THOMAS *et al.* eine Gruppe von CLK-Inhibitoren synthetisiert, von denen ausgewählte Substanzen ein verbessertes Selektivitätsprofil zeigten. Verbindung **3** entfaltete seine inhibitorische Wirkung ausschließlich innerhalb der CMGC Gruppe, wobei hier jedoch sowohl CLKs als auch DYRKs mit vergleichbarer Potenz im niedrig nanomolaren Bereich gehemmt wurden (Abbildung 4).²⁸

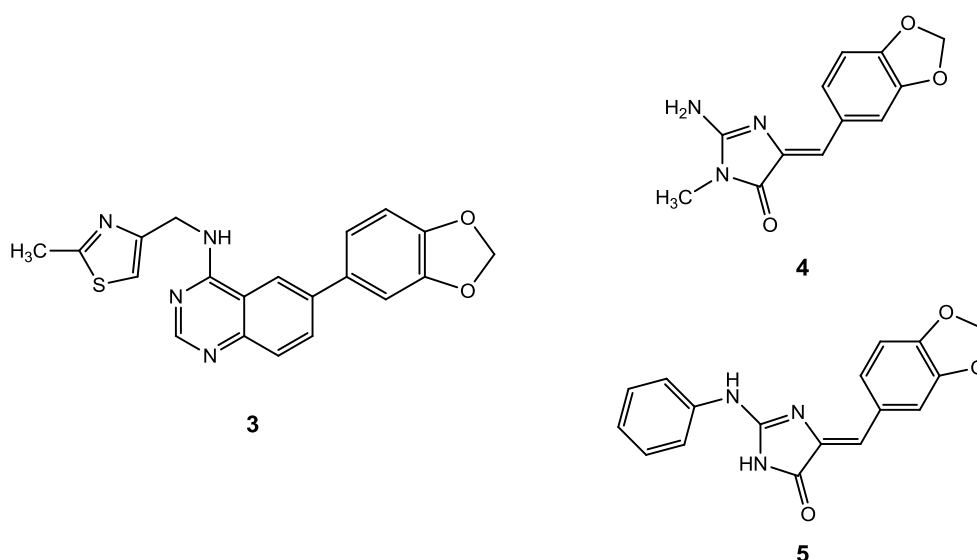


Abbildung 4: Vertreter der 6-Arylchinolin-4-amine **3** (K_d : CLK1 = 0.050 μ M, CLK2 = 0.380 μ M, CLK4 = 0.043 μ M, DYRK1A = 0.082 μ M); Leucettamin B **4**, Alkaloid eines marinen Schwamms (IC_{50} : CLK1 = 0.066 μ M, CLK2 = 2.1 μ M, CLK4 = 0.150 μ M, DYRK1A = 0.600 μ M) und sein Derivat Leucettin L41 **5** (IC_{50} : CLK1 = 0.071 μ M, CLK2 = 0.720 μ M, CLK4 = 0.064 μ M, DYRK1A = 0.060 μ M).

Auch unter den Naturstoffen konnten CLK-Inhibitoren gefunden werden. Das Alkaloid Leucettamin B **4** wurde aus dem marinen Schwamm *Leucetta microraphis* isoliert und als Hemmstoff von DYRKs und CLKs identifiziert. Nach chemisch-synthetischer Modifikation der Substituenten am Imidazolinon-Grundkörper wurde Leucettin L41 **5** erhalten, welches im Vergleich zu der Ausgangsstruktur eine gesteigerte Aktivität an den DYRK-Kinasen aufweist. In Studien über die biologischen Effekte hat sich **5** als neuroprotektiv wirkend herausgestellt, indem es den durch Glutamat induzierten Zelltod in HT22-Zellen gemindert und dem neurodegenerativen Effekt von transfiziertem APP (*amyloid precursor protein*) entgegenge-

wirkt hat. Die Autoren sprachen dabei den multikinaseinhibitorischen Eigenschaften einen synergistischen Effekt zu.²⁹

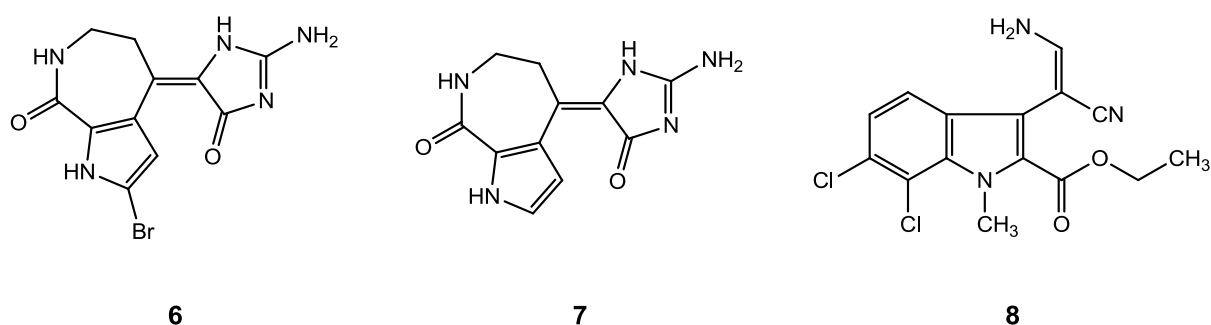


Abbildung 5: Hymenialdisin **6**, Debromohymenialdisin **7** und KH-CB19 **8**.

Für die Anfertigung von Röntgen-Co-Kristallstrukturen von CLK1 wurden zwei weitere Inhibitoren verwendet, die hier Erwähnung finden sollen. KNAPP *et al.* setzten den Naturstoff Hymenialdisin **6**, welcher als unselektiver Kinaseinhibitor bekannt ist und insbesondere Kinasen der CMGC Gruppe (u.a. CDK1, CDK2 und GSK3 β) in niedrig nanomolarer Konzentration hemmt, zur Inkubation mit CLK1 unter Kristallisationsbedingungen ein.³⁰ Für CLK1 wurde bei Hemmung durch **6** eine Restaktivität von 5.1% (\pm 0.1) bei einer Inhibitorkonzentration von 0.1 μ M bestimmt. Nach Lösung der Röntgenstruktur (PDB: 1Z57) zeigte sich jedoch, dass tatsächlich Debromohymenialdisin **7** in der ATP-Bindetasche gebunden war, bei dem es sich um einen im Vergleich schwächeren CLK1-Inhibitor handelt (CLK1-Restaktivität bei 0.1 μ M Inhibitorkonzentration: 34.1% \pm 5.1).⁹ Die zweite in der PDB veröffentlichte CLK1-Kristallstruktur (2VAG) enthält den Inhibitor KH-CB19, der sich strukturell von dem Alkaloid Bauerin C aus dem Cyanobakterium *Dichotrix baueriana* ableitet und sowohl CLK1 (IC₅₀: 19.7 \pm 6 nM) als auch DYRK1A (IC₅₀: 55.2 \pm 6 nM) in zweistellig nanomolarer Konzentration hemmt.³¹

Wie die vorangehende Darstellung zeigt, wurden bereits verschiedene in ihrer Struktur variable CLK-Inhibitoren entwickelt, die zum Teil auch in geringer Konzentration aktiv sind. Ausreichende Selektivität der Verbindungen, insbesondere gegenüber der eng verwandten DYRK-Familie, konnte bisher jedoch nicht erreicht werden.

Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinases (DYRKs)

Ebenso wie die CLKs gehören die DYRKs zu den Serin/Threonin-Kinasen mit dualer Spezifität, die in ihren Substrat-Proteinen ausschließlich Serin- und Threonin-Reste phosphorylieren,

jedoch in einer Autophosphorylierungsreaktion zusätzlich auf Tyrosin-Reste Phosphat-Gruppen übertragen. Die Familie besteht aus fünf Isoformen und ist eng verwandt mit den CLKs.

Aufbau und Strukturvergleich mit CLK1

Auf Grund des gemeinsamen Substrats ATP sind der grundsätzliche Aufbau und insbesondere der Aufbau der ATP-Bindestelle aller Proteinkinasen sehr ähnlich, so auch der von DYRKs und CLKs. Mit Phenylalanin als *gatekeeper*-Aminosäure ist der Platz im hinteren Teil der Bindetasche beispielsweise in beiden Fällen eingeschränkt. In der *hinge*-Region sind die Aminosäuren *gk+1* bis *gk+3* weitestgehend identisch, nur in DYRK1A ist an der *gk+2* Position Methionin anstelle des Leucins in den übrigen Kinasen vorhanden. Die in Richtung C-Terminus folgenden Aminosäuren unterscheiden sich allerdings etwas stärker. Auf dem Boden der Bindetasche in DYRK2 ist ein Valin gegen das größere Isoleucin ausgetauscht und zusätzlich ersetzt Glu237 das Asp250, welches in CLK1 vorhanden ist. In beiden Fällen bleiben jedoch die grundsätzlichen Eigenschaften erhalten.

Außerhalb der ATP-Bindetasche finden sich deutlichere Unterschiede zwischen den DYRK- und CLK-Kinasen, wie beispielsweise die nur bei CLKs anzutreffende ausgeprägte β -*hairpin*-Schlaufe (300-317 in CLK1), die sich in der C-terminalen Domäne befindet und auf Grund ihrer Flexibilität in Röntgenkristallstrukturen nur unvollständig sichtbar ist. DYRKs weisen eine vergleichsweise größere N-terminale Domäne auf, für die unter anderem das DYRK-Homologie-(DH)-Motiv charakteristisch ist. Auch das für CLKs charakteristische EHLAMME-RILG Strukturmotiv ist in der C-terminalen Domäne der DYRKs nicht zu finden. Aber bereits innerhalb der DYRK-Familie gibt es Unterschiede, auf die Differenzen in der Substratspezifität und biologischen Wirkung zurückzuführen sind. Insbesondere in der CMGC-spezifischen Insertion ist die größte Varianz zwischen den einzelnen DYRKs zu finden. Die zuletzt genannten Unterschiede scheinen vor allem Auswirkungen auf die Substratspezifität der Kinasen zu haben, da die Bindestelle von Inhibitoren auf Grund der räumlichen Entfernung durch diese, wenn überhaupt, nur indirekt beeinflusst werden kann.³²

Biologische Funktionen im Zusammenhang mit dem *splicing*-Prozess

Das DYRK1A-Gen befindet sich auf Chromosom 21 des humanen Genoms, welches im Fall des Auftretens von Down-Syndrom entweder vollständig oder teilweise in dreifacher Anzahl

(Trisomie 21) vorliegt. In Feten, wie auch bei Erwachsenen mit Trisomie 21 konnte die Überexpression von DYRK1A nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die Kinase an der Entstehung der Symptomatik beteiligt ist. Menschen mit Down-Syndrom weisen zahlreiche phänotypische Veränderungen auf, die je nach Art der Mutation individuell verschieden sind. Gemeinsam sind jedoch eine in unterschiedlichem Ausmaß auftretende mentale Retardierung, sowie ein frühzeitiges Auftreten des Morbus Alzheimer, der zusätzliche geistige Beeinträchtigungen mit sich bringt. Mutationen des auch als *minibrain* bezeichneten orthologen DYRK1A-Gens in *Drosophila melanogaster* behinderten die Hirnentwicklung und führten zu geringerer Hirngröße, sodass angenommen wird, dass DYRK1A eine entscheidende Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt. Unter anderem wird die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein im Gehirn, die bei Down Syndrom zu beobachten ist, für die Ausbildung der Symptome verantwortlich gemacht. Es kommt zum Funktionsverlust des Proteins und zur Aggregation in neurofibrillären Bündeln, die letztlich zu Neurodegeneration führen. Als ein weiterer Einflussfaktor wird der Eingriff von DYRK1A in die Regulation der Aktivität von *splicing*-Faktoren, die das alternative *splicing* des Tau-Proteins steuern, betrachtet. Die Rolle der DYRK1A ist hierbei vergleichbar mit der zuvor beschriebenen Funktion der CLK1.³³ Auf Grund der funktionellen Verflechtung von DYRK1A und CLK1 ist es von umso größerer Bedeutung, selektive Inhibitoren in Untersuchungen zur Klärung der Relevanz beider Kinasen für die Pathogenese neurologischer Erkrankungen zu verwenden.

DYRK1A-Inhibitoren und deren Selektivität gegenüber CLKs

Inhibitoren für DYRK1A, den am besten charakterisierten Vertreter der DYRK-Familie, sind bereits in einiger Vielfalt vorhanden. Sofern die Selektivität der Verbindungen geprüft wurde, lässt sich oft eine gleichzeitige Aktivität an CLKs feststellen, ebenso wie die meisten ursprünglich als CLK-Inhibitoren entwickelten Substanzen Hemmung an DYRKs zeigten.

Die aus der gleichen Arbeitsgruppe stammende und mit dem CLK Inhibitor TG003 **2** strukturell eng verwandte Verbindung INDY **9** (Abbildung 6) hemmt die Aktivität von DYRK1A mit einem IC₅₀-Wert von 240 nM – weniger stark also als der eigentliche CLK-Inhibitor **2**. In einer Co-Kristallstruktur mit DYRK1A zeigt sich, dass die Hydroxyl-Funktion eine Wasserstoffbrücke zur *gk+3* Aminosäure Leu241 ausbildet, während der Sauerstoff der Ketongruppe eine Bindung zum konservierten Lys189 eingeht.³⁴

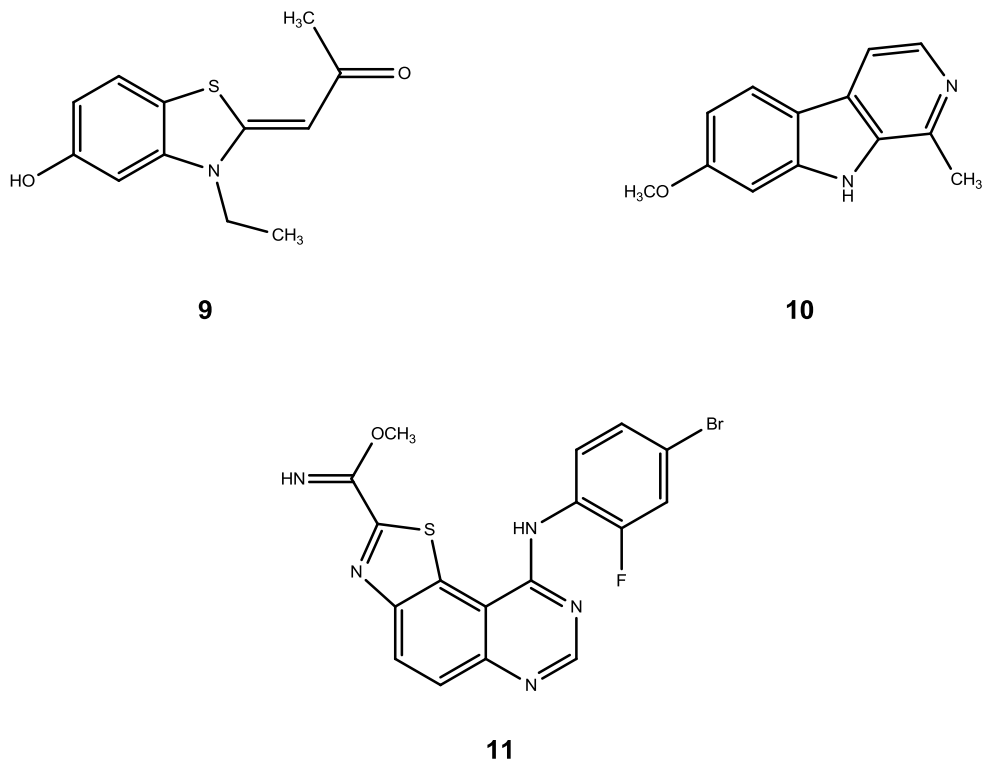


Abbildung 6: Literaturbekannte DYRK1A Inhibitoren: INDY **9** (IC_{50} : DYRK1A = 0.240 μ M), Harmin **10** (IC_{50} : DYRK1A = 0.082 μ M, DYRK1B = 0.028 μ M, DYRK4 = 9.5 μ M, CLK1 = 0.050 μ M) und die bisher potenteste Verbindung **11** (IC_{50} : DYRK1A = 0.00016 μ M, DYRK1B = 0.00024 μ M).

Der aus der Pflanze *Peganum harmala* isolierte Naturstoff Harmin **10** wird oft als Vergleich zur Einordnung der Wirkstärke neuer DYRK-Inhibitoren verwendet. Es handelt sich um einen potenten Hemmstoff aller DYRKs, ausgenommen DYRK4. Allerdings werden auch CLK Kinasen mit gleicher Stärke inhibiert, wodurch die Verwendbarkeit der Substanz in biologischen Untersuchungen eingeschränkt ist.²⁹

Als bisher potentester Inhibitor der DYRK1A wird Verbindung **11** beschrieben. Das Thiazolochinazolin-Derivat ist ein picomolarer Hemmstoff von DYRK1A und DYRK1B, der als potentieller Wirkstoff zur Verwendung bei Alzheimer oder Down-Syndrom-Patienten entwickelt wurde. Die Wirkung an weiteren Kinasen wurde bisher nicht getestet.³⁵

Von den Selektivitätsprofilen der erwähnten DYRK-Inhibitoren gegenüber CLKs lässt sich ablesen, dass Selektivität zwischen diesen eng verwandten Kinase-Familien schwer erreichbar scheint und bisher nur unzureichend verwirklicht wurde.

Serine Arginine-rich Protein Kinases (SRPKs)

Mitglieder der SRPK-Familie sind konstitutiv aktive Kinasen, die Substrate ausschließlich an Serin-Resten phosphorylieren. Es wurde dabei eine strenge Spezifität für SR-Proteine

beobachtet, denn Mutationen von Serin zu Threonin oder von Arginin zu Lysin im Substratprotein verhinderten in Untersuchungen dessen Phosphorylierung.³⁶

Aufbau und Strukturvergleich mit CLK1

Die Makrostruktur der SRPKs ist vergleichbar mit anderen Serin-Threonin-Kinasen und lässt sich in eine kleinere N-terminale sowie eine größere C-terminale Domäne gliedern. In der ATP-Bindetasche von SRPK1 und SRPK2 sind im Vergleich zu CLK1 insbesondere zwei wichtige Unterschiede zu bemerken: Zum einen handelt es sich bei der *gk+2* Aminosäure um Valin anstatt Leucin, zum anderen ist das Asp250 in der Helix am Eingang der Bindetasche gegen Lysin ausgetauscht, was sich auf die Bindung von Inhibitoren auswirken kann. Weiterhin auffällig ist die Abweichung dieser Familie von dem Kinase-typischen DFG-Motiv in der Aktivierungsschleife, in der bei den SRPKs das Phenylalanin durch ein Leucin ersetzt wurde. Obwohl SRPKs gegenüber den CLKs Ähnlichkeiten in ihrer Substratspezifität aufweisen, da sie ebenso SR-Proteine phosphorylieren, sind sie nicht den LAMMER-Kinasen zuzuordnen, da ihnen dieses konservierte Strukturelement in der C-terminalen Domäne fehlt.

Biologische Funktionen im Zusammenhang mit dem *splicing*-Prozess

SRPKs sind in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, wobei ihre Rolle nicht immer eindeutig bekannt ist. Unter anderem wurde eine Relevanz der Kinasen in der Spermatogenese und in der Chromatin-Kondensation während der Mitose beschrieben.³⁶

Des Weiteren bindet SRPK1 mit hoher Affinität an den *splicing*-Faktor ASF/SF2, bei dem es sich um ein SR-Protein handelt, welches an der Regulation des *splicings* der Tau-mRNA beteiligt ist und auch durch CLKs phosphoryliert wird. Erst nach dessen Phosphorylierung im Cytosol an ca. zehn Serin-Resten wird die Bindung zu SRPK1 wieder gelöst und das ASF/SF2 wandert in den Zellkern, in dem es sich in den *nuclear speckles* sammelt. Nach weiterer Phosphorylierung z.B. durch CLKs wird es daraus freigesetzt, sodass ein regulatorischer Eingriff in das *splicing* möglich wird. Zusätzlich zu ihrer Aktivität im Cytosol können SRPKs ebenso Phosphorylierungen im Zellkern durchführen, jedoch sind die genauen Auswirkungen auf Grund der zahlreichen anderen beteiligten Kinasen bisher nicht im Detail bekannt.^{36, 37}

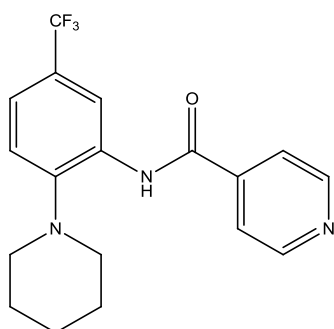
Auch im Zusammenhang mit viralen Infektionen wird die Wichtigkeit von SRPKs diskutiert. So benötigen zahlreiche Viren zur Erzeugung eines vielfältigen Proteoms aus begrenztem

genetischem Material die *splicing*-Apparatur ihres Wirtes. In einem Modell-Versuch von HAGIWARA *et al.* wurde die Abhängigkeit der HIV-Expression von der SRPK2-Aktivität und der damit verbundenen Stabilisierung des *splicing*-Faktors SRp75 gezeigt. Die Phosphorylierung von SRp75 durch SRPK2 führte zu einer 20-fach erhöhten Virus-Produktion, daher stellen Inhibitoren dieser Kinase eine mögliche Zielstruktur für zukünftige antivirale Wirkstoffe dar.³⁸

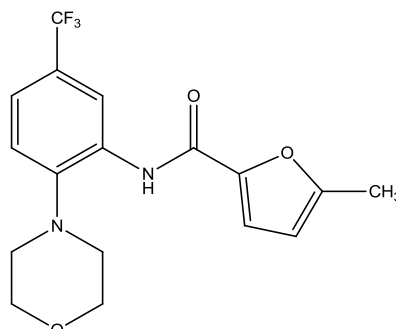
SRPK-Inhibitoren und deren Selektivität gegenüber CLKs

Das Isonicotinsäure-Derivat SRPIN340 **12** (Abbildung 7) wurde in einem Screening als Inhibitor von SRPK1 und SRPK2 identifiziert, wobei die Restaktivitäten der Kinasen bei einer Substanzkonzentration von 10 µM 0.8% (SRPK1) bzw. 15% (SRPK2) betrugen. Biologische Untersuchungen an dem subgenomischen HCV-Replikonsystem³⁹ zeigten, dass **12** die Anzahl an HCV-Replikons senkte und somit die Vervielfältigung des Virus hemmte. Im Fall des HI-Virus waren die Ergebnisse allerdings weniger eindeutig.^{38, 40} Dennoch stellen die SRPKs eine mögliche Zielstruktur in der antiviralen Therapie dar.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Inhibitorklasse zu einer Reduktion der choroidalen Neovaskularisation führt, die mit dem Fortschreiten der altersbedingten feuchten Makuladegeneration (AMD) in Verbindung gebracht wird. Die Wirkung entsteht durch Verschiebung des Verhältnisses zwischen proangiogenem und antiangiogenem VEGF, indem eine Modifikation des *splicings* stattfindet. Bei Verbindung **13** handelt es sich um ein mit **12** strukturverwandtes Derivat, welches eine verbesserte Aktivität an SRPK1 zeigt, jedoch an SRPK2 nicht aktiv ist.⁴¹ Bei der Bestimmung der Restaktivität verschiedener Kinasen zur Untersuchung des Selektivitätsprofils von **13** (10 µM) wurde nur für die humane ALK eine Reduktion auf unter 50% der Normaktivität gefunden.³⁸



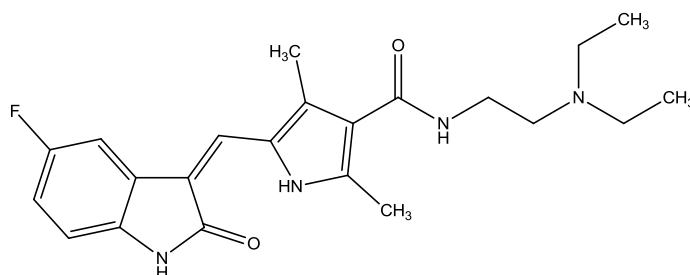
12



13

Abbildung 7: Antiviral wirkender SRPK1- und SRPK2-Inhibitor SRPIN340 **12** (IC_{50} : SRPK1 = 0.960 μ M, SRPK2 = 7.4 μ M) und das abgeleitete Derivat SPHINX **13** (IC_{50} : SRPK1 = 0.580 μ M, SRPK2 > 10 μ M).

Neben den als SRPK-Inhibitoren entwickelten Verbindungen **12** und **13** konnte auch bei einigen Multikinase-Inhibitoren eine hemmende Wirkung auf die SRPKs beobachtet werden. Unter anderem wies z.B. Sunitinib **14**, eine von Pfizer als Tyrosinkinase-Inhibitor entwickelte Substanz, sowohl an CLKs als auch an SRPKs IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich auf (Abbildung 8). Momentan wird die Verbindung zur Therapie verschiedener fortgeschrittener Tumorerkrankungen angewendet.



14

Abbildung 8: Multikinase-Inhibitor Sunitinib entwickelt von Pfizer (IC_{50} : CLK1 = 0.022 μ M, DYRK1B = 2.3 μ M, SRPK1 = 0.250 μ M, SRPK2 = 0.190 μ M).⁴²

Auf Grund der geringen Anzahl an bekannten SRPK-Inhibitoren ist bisher nur schwer einschätzbar, ob häufige Kreuzaktivität an SRPKs und CLKs zu erwarten wäre. Das Selektivitätsprofil von SRPIN340 **12** und die größeren strukturellen Unterschiede zwischen diesen Kinase-Familien deuten jedoch darauf hin, dass eine Selektivität gegenüber CLKs einfacher zu erreichen ist, als dies zwischen CLKs und DYRKs der Fall ist.

1.3 Indirubin als Kinaseinhibitor

Ursprung und biologische Aktivität

Als Strukturisomer des Indigos wurde das rotgefärbte Indirubin **16** erstmals 1870 von BAEYER und EMMERLING beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Folgeprodukt aus den Naturstoffen Isatan B und Indican, die beispielsweise in Färberwaid (*Isatis tinctoria*) zu finden sind und erst durch Hydrolyse und Oxidation zu Indirubin oder Indigo umgesetzt werden.⁴³⁻⁴⁵

Bei Untersuchungen an verschiedenen Kinasen wurde Indirubin als moderater Inhibitor mehrerer Serin-Threonin-Kinasen identifiziert. Vor allem Kinasen der CMGC-Gruppe, der auch die CLKs angehören, wurden mit IC_{50} -Werten im niedrig mikromolaren Bereich gehemmt, wie zum Beispiel CDK2/CyclinA (IC_{50} : 2.2 μ M) und GSK3 β (IC_{50} : 1.0 μ M). Dagegen erwies sich Indirubin als untoxisch an humanen SH-SY5Y-Zellen.^{46, 47} Insgesamt liegen daher gute Voraussetzungen vor, um die Verbindung als strukturelle Grundlage für die Entwicklung neuer Serin-Threonin-Kinase-Inhibitoren zu verwenden.

Strukturelle Ableitung der Mini-Indirubine

Entscheidend für die Aktivität des Indirubins ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region zum einen über die Lactam-Struktur des Isoindolin-2-ons und zum anderen über den Stickstoff des Isoindolin-3-ons, der sich auf der gleichen Seite des Moleküls befindet. In einer Co-Kristallstruktur des 5-Sulfonyl-Derivates mit CDK2 (PDB: 1E9H, Abbildung 9) ist genau dieses Bindungsmotiv zu beobachten. In diesem Fall wird außerdem zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zum konservierten Lysin33 über den Sulfonyl-Rest ausgebildet, die eine starke Aktivitätserhöhung zur Folge hat ($IC_{50(CDK2)}$: 0.035 μ M).

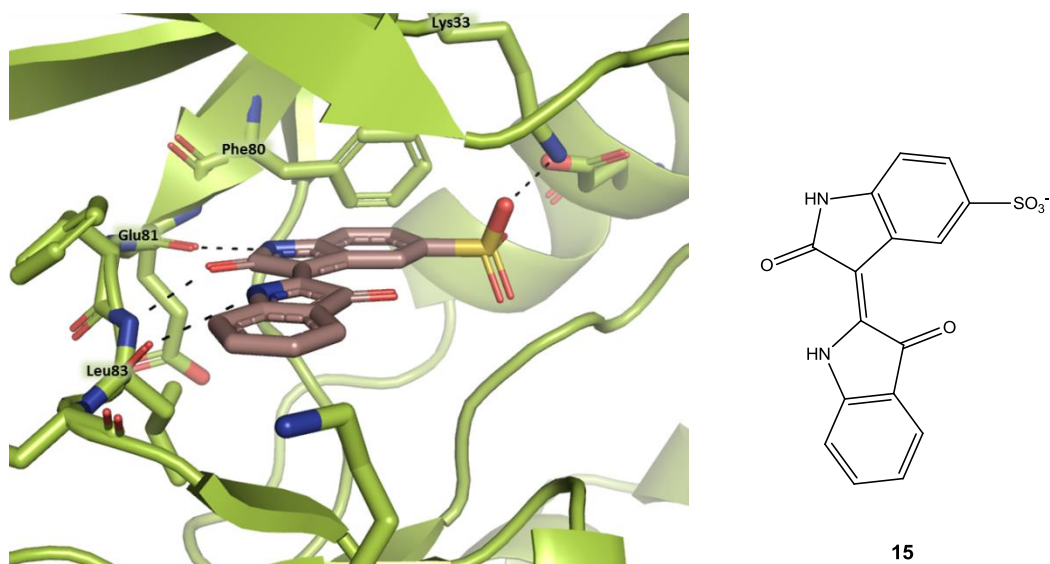


Abbildung 9: Kristallstruktur von Indirubin-5-sulfonat **15** in der ATP-Bindetasche der CDK2 (PDB: 1E9H).

Vor diesem Hintergrund sollte das in Abbildung 10 rot markierte (Z)-1,3-Dihydro-[2,3'-bipyrrolyliden]-2'(1'*H*)-on-Fragment als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer neuen Klasse von CLK-Inhibitoren dienen. Die Potenz und die Selektivität, die in Indirubin nur unzureichend vorhanden sind, sollten in den Vertretern der neuen Substanzklasse durch Variation von Substituenten an der Grundstruktur erzeugt werden.

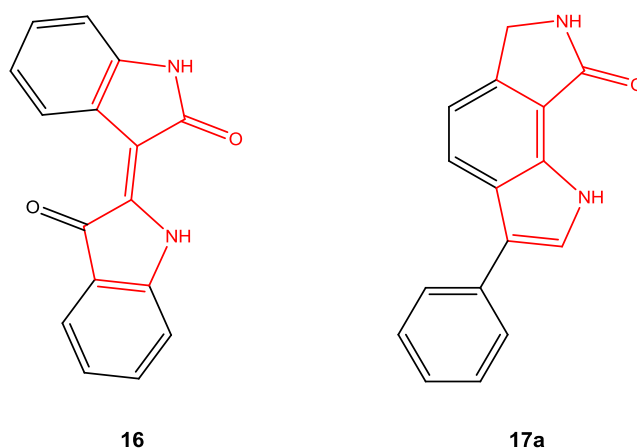


Abbildung 10: Indirubin **16** und die strukturelle Verwandtschaft zu der Verbindungsklasse **17**; rot: gemeinsames Strukturmotiv.

In der ersten von Indirubin abgeleiteten Verbindung wurden die fünf-Ring Systeme über einen Benzen-Ring verknüpft, sodass ein anelliertes System aus drei Ringen entstand. Durch Einführung eines Phenyl-Rests gelangt man zu Verbindung **17a**, dem ersten Vertreter der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one.

2 Zielsetzung

2.1 Design und Synthese neuer CLK-Inhibitoren

Auf Grund der potentiellen Verwendbarkeit von CLK-Inhibitoren zur Therapie von Erkrankungen, deren Pathogenese durch eine Fehlregulation des *splicing*-Prozesses begünstigt ist, besteht ein Interesse an der Entwicklung potenter und gleichzeitig selektiver Inhibitoren. Bisher veröffentlichte Verbindungsklassen konnten nicht beide Anforderungen zugleich erfüllen, sodass ein Bedarf an weiteren CLK-Inhibitoren mit verbesserten Eigenschaften besteht.

In vorangegangener Arbeit wurden von DETERMANN unterschiedlich substituierte 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **18** synthetisiert, die ebenfalls den Kern von Verbindung **17a** aufwiesen.⁴⁸ Untersuchungen zur prozentualen Restaktivität an Kinasen der CLK- und DYRK-Familie bei einer Konzentration von 10 μ M des Inhibitors zeigten meist eine hohe residuale Aktivität, sowie eine nur geringe Selektivität.

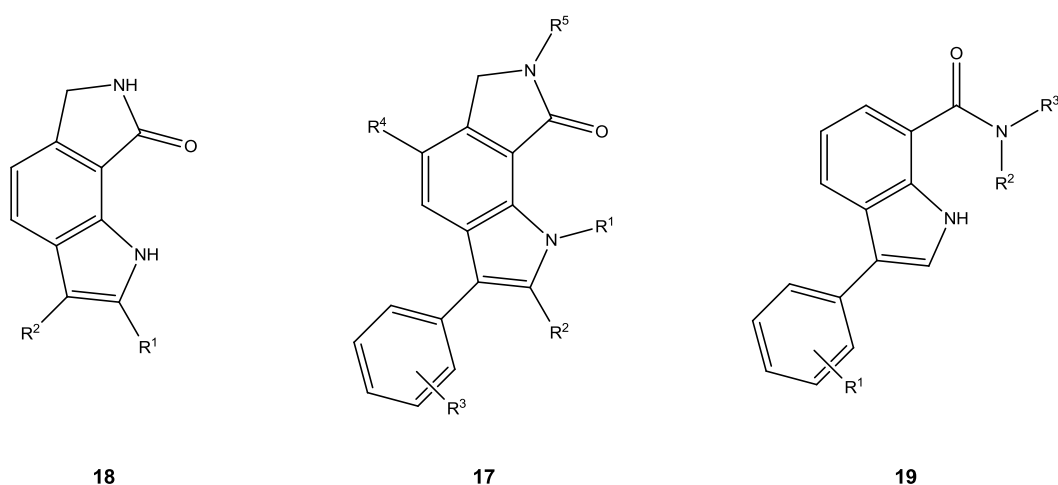


Abbildung 11: Grundkörper der von DETERMANN hergestellten 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on Derivate **18** und die davon abgeleiteten Strukturklassen **17** und **19**.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten sollten zusätzliche Derivate ausgehend von dem 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundkörper dargestellt werden. Mit dem Ziel, potentere und selektivere CLK-Inhibitoren zu entwickeln, sollten die Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) in der Verbindungsklasse erweitert werden.

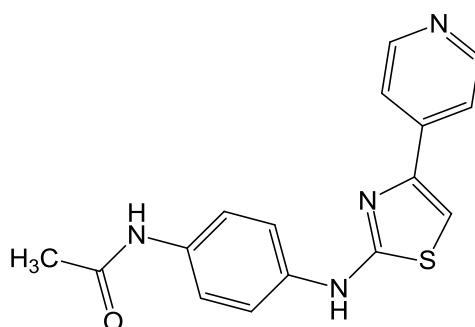
An Hand von *docking*-Studien sollte zunächst eine Hypothese bezüglich des Bindemodus der Verbindungsklasse in CLK1 aufgestellt werden. Sich aus den beobachteten *docking*-Posen

verschiedener Derivate ergebende Wechselwirkungen mit der ATP-Bindetasche sollten zur Auswahl geeigneter Vertreter für die Synthese herangezogen werden. Nach ersten biologischen Tests stellte sich das 3-Phenyl-Derivat **17a** als ein geeigneter Ausgangspunkt für die Variation weiterer Positionen der Grundstruktur heraus (s. Abbildung 11, **17**).

Zudem sollte untersucht werden, inwiefern das Lactam-Strukturelement der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one für die Bindung an die Kinase von Bedeutung ist. Zu diesem Zweck sollten verschieden substituierte, offenkettige Amide der Struktur **19** dargestellt werden.

2.2 Virtuelles Screening

Um die Möglichkeit zu schaffen, unabhängig von bisherigen Verbindungsklassen das Ziel der Entwicklung selektiver CLK-Inhibitoren zu verfolgen, sollte ein Computer-basiertes Screening von Bibliotheken kommerziell erhältlicher Substanzen erfolgen. Mit Hilfe des *scaffold-hoppings* sollten so, ausgehend von den 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen, chemisch neuartige Verbindungen als CLK-Inhibitoren identifiziert werden. Als Strategie sollten die Methoden der zweidimensionalen Datenbanksuche, des Pharmakophor-basierten Screenings und des molekularen *dockings* synergistisch miteinander kombiniert werden. Dabei sollten ausschließlich solche Bibliothekssubstanzen einbezogen werden, die in ihren physiko-chemischen Eigenschaften den allgemeinen Anforderungen in der Neuentwicklung von Arzneistoffen entsprechen. Als Referenz wurden hierbei die von LIPINSKI *et al.* aufgestellten Kriterien verwendet.⁴⁹



20a

Abbildung 12: Im Rahmen des virtuellen Screenings identifizierte *Hit*-Struktur **20a** aus der Klasse der 2,4-disubstituierten 1,3-Thiazole.

Nachdem Verbindung **20a** als moderater CLK1-Inhibitor identifiziert worden war, sollten weitere Derivate dieser Strukturklasse auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht werden. Zur Beurteilung der Selektivität gegenüber CLKs sollten außerdem Differentielle Scanning Fluorimetrie-(DSF)-Experimente an verschiedenen Kinasen durchgeführt werden.

3 Molekulares *docking*

Für die rationale Entwicklung neuer Kinase-Inhibitoren spielt die Kenntnis der Position des potentiellen Inhibitors in der jeweiligen Bindetasche eine wichtige Rolle. Dabei bietet das molekulare *docking* die Möglichkeit zur Aufstellung einer Hypothese bezüglich des Bindemodus, sofern keine Co-Kristallstruktur existiert. Hierbei wird in einer Computergestützten Simulation das Inhibitor-Molekül in die Bindetasche des Targets eingepasst und das Ergebnis durch Algorithmen in Hinblick auf seine Plausibilität bewertet.

In der praktischen Anwendung stehen verschiedene Methoden zur Durchführung dieser Simulation zur Verfügung. Für die vorliegende Arbeit wurde das Programm GOLD (*genetic optimisation for ligand docking*)⁵⁰ verwendet, welches im Vergleich mit anderen Programmen sehr gute Ergebnisse in der Vorhersage von Protein-Ligand-Interaktionen erreichte.⁵¹ Als Basis für die Berechnung möglicher Bindemodi wird die Kristallstruktur des Proteins benötigt, die in den Fällen der CLK1-3, DYRK1A und SRPK1 in der im Internet frei verfügbaren PDB-Datenbank hinterlegt war.⁵² Da die Kristalldaten der Kinasen lediglich Raumkoordinaten für die schweren Atome des Proteins und des gegebenenfalls co-kristallisierten Inhibitors enthielten, war eine Vorbereitung für den *docking*-Prozess erforderlich. Das *Molecular Operating Environment* (MOE)⁵³ bot die Möglichkeit, die fehlenden Wasserstoffatome unter Berücksichtigung eines neutralen Umgebungs-pH-Wertes zu ergänzen. Außerdem wurden in den Kristallstrukturen enthaltene Wassermoleküle sowie in der ATP-Bindetasche vorhandene Inhibitoren entfernt. Liganden, die in die ATP-Bindetasche gedockt werden sollten, wurden in MOE erstellt und dort einer Energieminimierung unterzogen.

In dem von GOLD verfolgten Ansatz zur Einpassung der Inhibitoren in die Bindetasche wird eine statische Proteinstruktur verwendet, in der lediglich Seitenketten einzelner Aminosäuren als beweglich definiert werden können. Dagegen ist die Konformation der zu dockenden Liganden vollständig flexibel. Während eines *dockings* werden, basierend auf einem sogenannten genetischen Algorithmus (GA), mehrere Posen des Inhibitors in der Bindeta-

sche generiert, wobei sowohl die Orientierung des Liganden im Raum als auch dessen Konformation verändert wird.⁵⁰ Eine Gruppe initial erstellter Posen wird hierbei zufällig variiert (Mutation). Die neu erhaltenen Posen werden dann auf ihre Güte hin evaluiert und die besten für den folgenden Schritt selektiert. Insgesamt handelt es sich um einen iterativen Prozess, der mehrmals in Folge durchlaufen wird, sodass eine schrittweise Annäherung an ein optimales Ergebnis erfolgt. Diese Vorgehensweise kann mit der Evolutionstheorie nach Darwin verglichen werden, denn zunächst entstehen ungerichtete Mutationen, auf welche dann ein Selektionsdruck in Richtung der besten Einpassung des Inhibitors in die Bindetasche folgt.⁵⁴ Für die abschließende Bewertung der finalen Gruppe von Inhibitor-Posen können verschiedene Bewertungsalgorithmen, auch *scoring functions* oder Fitness-Funktionen genannt, verwendet werden. Bei *chemscore* handelt es sich um einen empirischen Bewertungsalgorithmus, der sich aus mehreren Termen zusammensetzt, die unterschiedliche Aspekte der Bindung zwischen Ligand und Protein basierend auf experimentell bestimmten Bindungsenergien beschreiben.⁵⁵ Beispielsweise werden Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen und rotierbare Bindungen des Liganden berücksichtigt.^{56, 57} Da für *chemscore* ein Set an Parametern speziell für das *docking* mit Kinasen entwickelt wurde, eignete sich dieser Algorithmus besonders für die Bindungssimulation potentieller CLK-Inhibitoren. Der resultierende Wert der Fitness-Funktion ergibt sich aus der vorhergesagten Bindungsenthalpie abzüglich eines Terms für Kollisionen und energiereiche Torsionswinkel und kann bei dem Vergleich mehrerer Posen als Anhaltspunkt zur Einordnung der Güte dieser Posen dienen.

3.1 Rationales Design neuer 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one 17

Zunächst wurde eine *docking*-Analyse mit Verbindung **17a** in CLK1 (PDB: 1Z57)⁹ durchgeführt, um einen grundsätzlichen Eindruck über die Interaktionsmöglichkeiten der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one mit der ATP-Bindetasche zu gewinnen. Als dominierende Pose wurde die in Abbildung 13 dargestellte Orientierung in der Bindetasche identifiziert. Das obere Bild zeigt den gesamten Raum der ATP-Bindestelle und verdeutlicht, dass Verbindung **17a** vornehmlich mit der *hinge*-Region interagiert, während keine Wechselwirkungen mit dem Glutamat der α C-Helix und dem konservierten Lysin der N-terminalen Domäne zu beobachten sind.

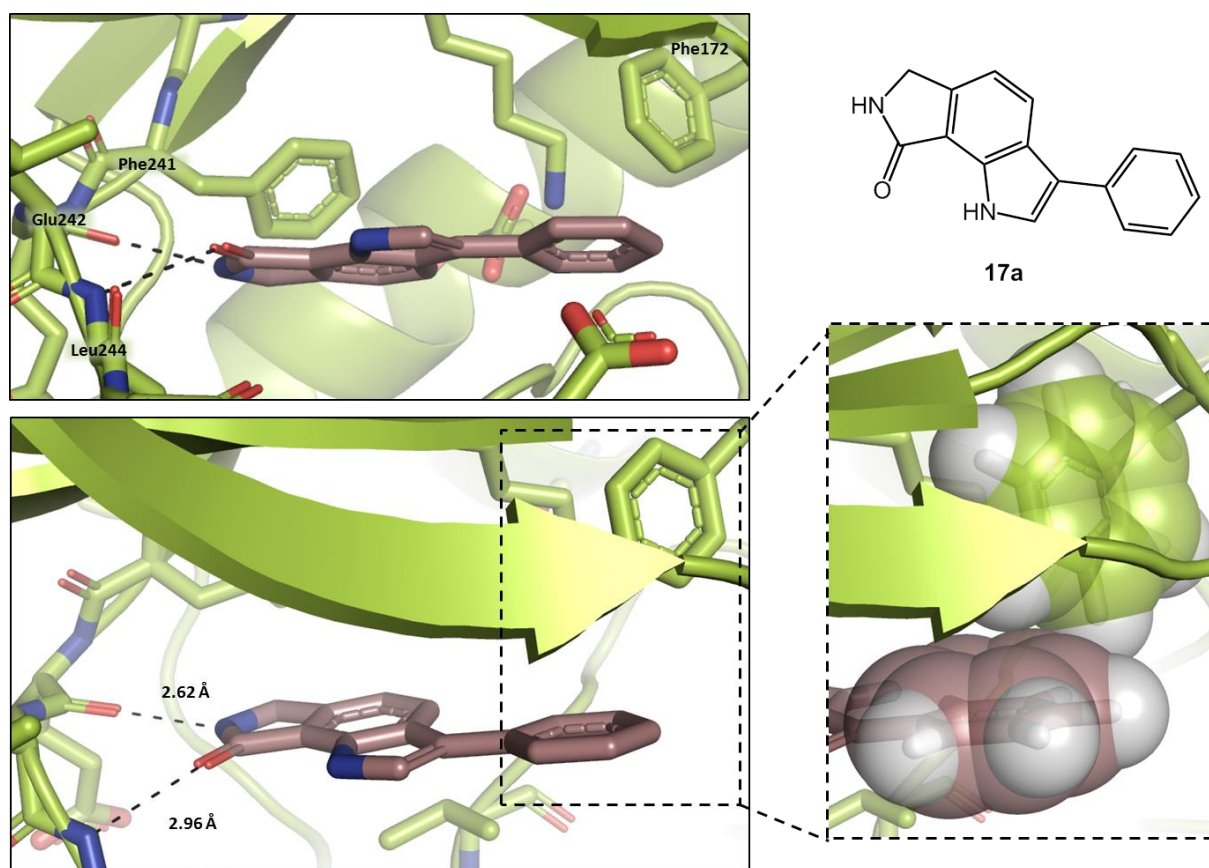


Abbildung 13: Ergebnis des *dockings* von **17a** in die ATP-Bindetasche von CLK1 (PDB: 1Z57) nach Entfernung des co-kristallisierten Inhibitors Debromohymenialdisin **7**. *rechts*: Vergrößerte Darstellung der *edge-to-face*-Wechselwirkung zwischen dem 3-Phenyl-Ring und der Seitenkette von Phe172 mit Hilfe der Oberflächen; *unterbrochene schwarze Linie*: Wasserstoffbrücken.

Wasserstoffbrückenbindungen werden zu dem Peptid-Rückgrat der *gk+1* (Glu242)- sowie der *gk+3*-Aminosäure (Leu244) ausgebildet, wobei das Carbonyl-Sauerstoffatom der Lactam-Struktur des Inhibitors als Akzeptor und die NH-Funktion als Donator agiert. Im unteren Bild lässt sich erkennen, dass die Abstände zwischen den schweren Atomen, die an der Bindung beteiligt sind, mit 2.6 Å bzw. 2.9 Å im typischen Bereich von Wasserstoffbrückenbindungen liegen.⁵⁸ Ebenso erfüllen die jeweiligen NH \cdots O-Winkel (156.8°, 155.9°) das Kriterium für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, denn für eine starke Interaktionen wird ein Winkel > 110° (möglichst nahe 180°) als günstig beschrieben.⁵⁹ Hydrophobe Interaktionen können zwischen dem planaren, lipophilen Ringsystem des Inhibitors und der hydrophoben Seitenkette des Valins (Val324) und Leucins (Leu295) am Boden der Bindetasche, sowie mit Val175 aus der N-terminalen Domäne beobachtet werden. Die Darstellung der Oberflächen des 3-Phenyl-Restes von Verbindung **17a** und der Seitenkette des Phe172 in Abbildung 13 rechts lässt deutlich werden, dass es hier zu einer sogenannten *edge-to-face*-Wechselwirkung zwischen beiden Aromaten kommt, welche zur Affinität des Inhibitors

beiträgt. Es handelt sich dabei um eine schwache Interaktion der delokalisierten π -Elektronen eines aromatischen Rings mit dem partiell positiv geladenen Wasserstoffatom eines zweiten aromatischen Systems, das in Richtung des Zentrums des ersten Ringes ausgerichtet ist. Im Vergleich zu der Bindungsenthalpie, die bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken frei wird, ist die Energiebarriere der Bindungsspaltung in diesem Fall eher gering ($\Delta G \approx -1.5$ bis -2.5 kcal/mol).⁶⁰

Ausgehend von dem beschriebenen Bindungsmodus boten sich verschiedene Positionen des 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundkörpers zur Derivatisierung an, um zusätzliche Protein-Ligand-Interaktionsmöglichkeiten zu schaffen. In einer ersten Serie wurde die Auswirkung verschiedener Substituenten an dem 3-Phenyl-Ring des Inhibitors untersucht, da diese Position auch synthetisch leicht zugänglich war (Abbildung 14). Durch Einführung einer Hydroxyl-Funktion an Position 3 wurde in *docking*-Studien eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung (Asp250) vorhergesagt, die jedoch zu einer Rotation des Phenyl-Restes führte, sodass die *edge-to-face*-Wechselwirkung mit Phe172 nicht mehr möglich war (Abbildung 14A). Es ist allerdings davon auszugehen, dass die zusätzliche Wasserstoffbrücke einen Enthalpiegewinn bewirkt, welcher den Verlust der *edge-to-face* Interaktion bei weitem überkompensiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die in der zu optimierenden Verbindung **17a** über das Lactam-Strukturelement zur *hinge*-Region ausgebildet wurden, blieben unverändert erhalten. Auch durch einen 3-Chlor-Substituenten wurde die Orientierung in der Bindetasche gegenüber der Grundstruktur praktisch nicht verändert (Abbildung 14B). Ebenso zeigten die Ergebnisse für eine 2-Chlor- sowie für eine 3-Methoxysubstitution abgesehen von einer leichten Rotation des 3-Phenyl-Rings keine entscheidenden Veränderungen des Bindemodus. Die beobachtete Gleichförmigkeit der Orientierung der Derivate in der Bindetasche und die Tatsache, dass durch die Substituenten, mit Ausnahme der phenolischen Hydroxylgruppe, keine polaren Interaktionen zu der Kinase ausgebildet wurden, deuteten auf einen geringen Einfluss kleinerer Substituenten auf die Aktivität an der CLK1 hin. Einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen bietet auch die allgemeine Betrachtung der Position des Phenyl-Rests, der sich am Eingang der Bindetasche befindet und dessen Substituenten daher zum Teil in Richtung Lösemittel ausgerichtet sind. Dennoch sollten sich in diesem Bereich durch komplexere Substituenten mit Wasserstoffbrücken-Akzeptor- oder -Donator-Fähigkeiten zusätzliche Interaktionsmöglichkeiten schaffen lassen.

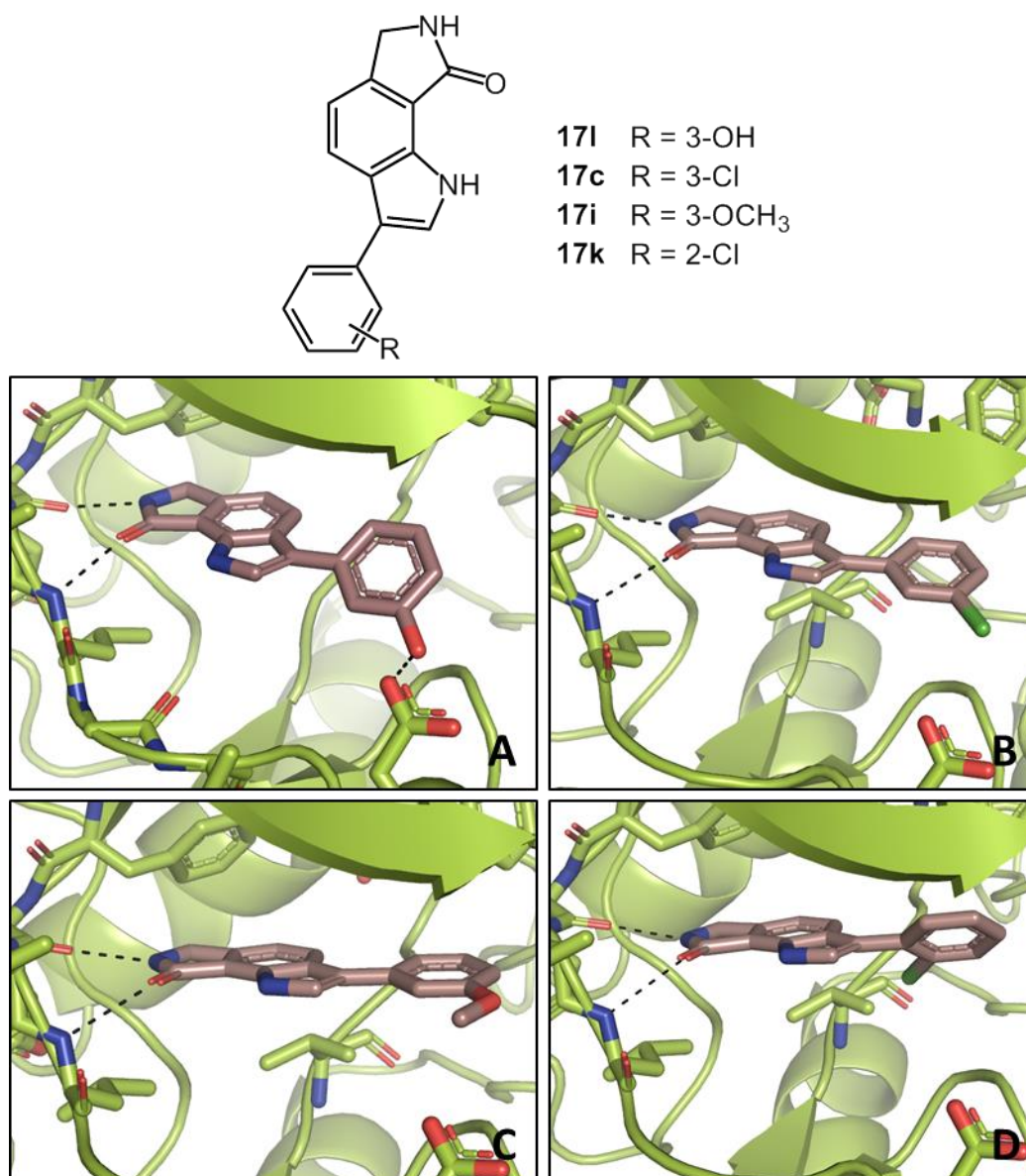


Abbildung 14: Docking-Posen von am 3-Phenylring substituierten Derivaten von **17a**. **A:** 3-Hydroxyphenyl-Substituent (**17l**); **B:** 3-Chlorophenyl-Substituent (**17c**); **C:** 3-Methoxyphenyl-Substituent (**17i**); **D:** 2-Chlorophenyl-Substituent (**17k**); unterbrochene schwarze Line: Wasserstoffbrückenbindungen.

Da die Grundstruktur die Bindetasche hauptsächlich im Bereich der *hinge*-Region ausfüllte, während die hintere Tasche nahe der α C-Helix unbesetzt blieb, wurden die *docking*-Ergebnisse für verschiedene Substituenten in 5-Position im Hinblick auf die Nutzung dieses Bereichs untersucht. Ein Brom-Substituent füllt die Bindetasche sehr gut aus, ohne dass es zu Kollisionen mit der Oberfläche des Proteins kommt (Abbildung 15A und B). Durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen wäre demnach eine Steigerung der Aktivität des Inhibitors zu erwarten. Im Vergleich dazu zeigt die in Abbildung 15C und D im Fall eines Phenyl-Substituenten sichtbare Überschneidung der Liganden-Oberfläche (Gitternetz) und der Protein-Oberfläche (grau) deutlich, dass das Volumen dieses Substituenten die Kapazität des

zur Verfügung stehenden Raumes überschreitet und es deshalb zu einer Kollision (*sterical clash*) kommt.

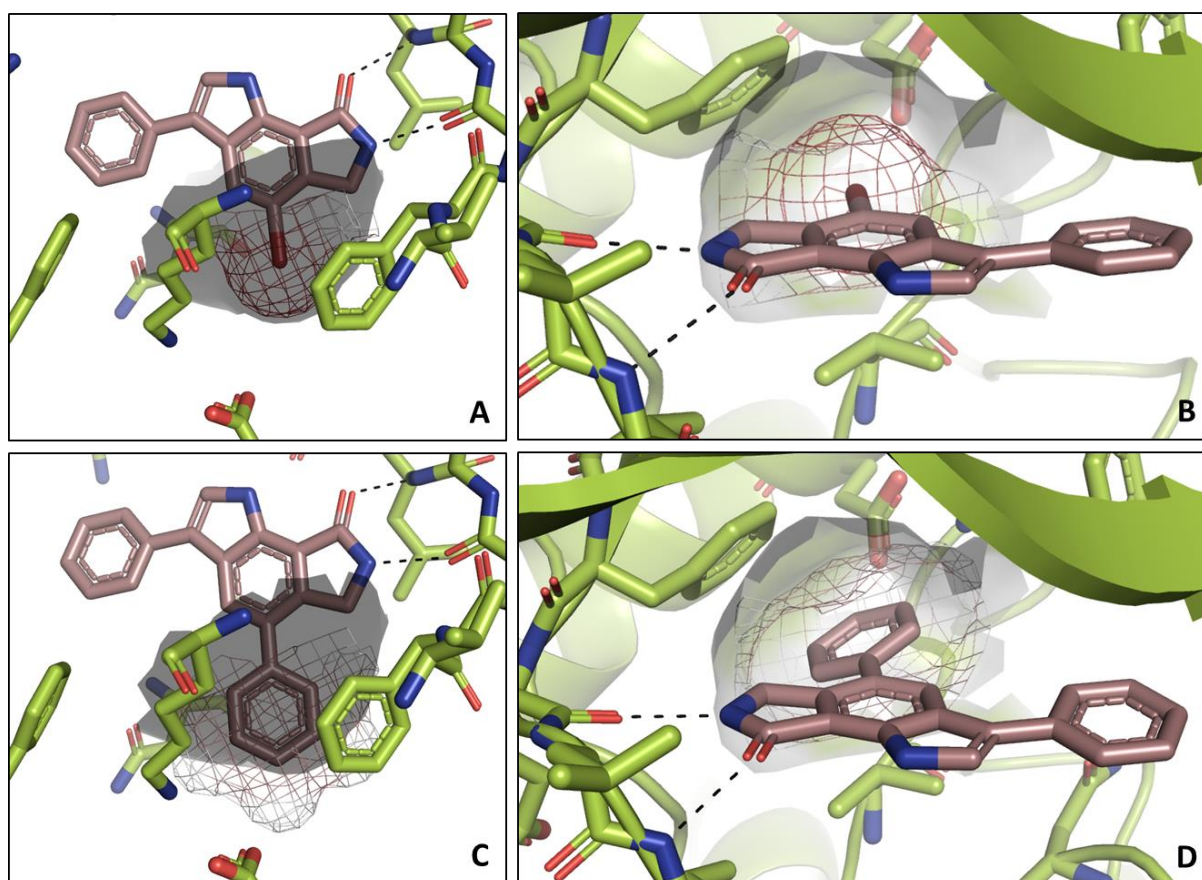
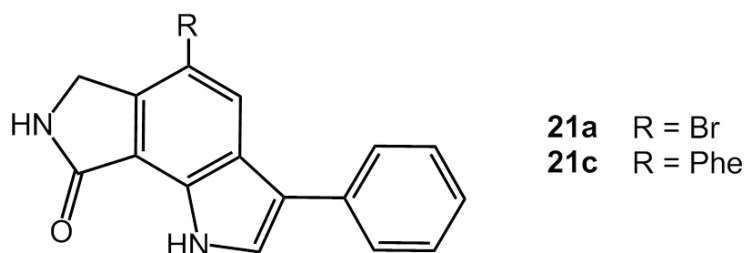


Abbildung 15: Vergleich der Ausfüllung der hinteren ATP-Bindetasche durch Substituenten an 5-Position des Grundkörpers **17**. **A:** 5-Brom-Substitution (**21a**), Aufsicht; **B:** 5-Brom-Substitution, Front-Ansicht; **C:** 5-Phenyl-Substitution, Aufsicht; **D:** Phenyl-Substitution (**21c**), Front-Ansicht; grau: Protein-Oberfläche, Gitternetz: partielle Liganden-Oberfläche; unterbrochene schwarze Linie: Wasserstoffbrückenbindungen.

Somit wäre zu erwarten, dass bei 5-Phenylderivaten eine schwächere Inhibition der CLK1 beobachtet werden würde, da eine weniger ideale Position als die des unsubstituierten Derivats eingenommen werden müsste. Dagegen könnte für fünfgliedrige Ringe, wie beispielsweise Thiophen oder Tetrazol, noch ausreichend Raum vorhanden sein. Um die Wichtigkeit der Stickstoffatome des Inhibitor-Grundkörpers für die Affinität näher

charakterisieren zu können, wurden *docking*-Studien mit den selektiv methylierten Derivaten durchgeführt. In Abbildung 16 ist auf der linken Seite das Ergebnis für die einfach am Indol-Stickstoffatom alkylierte Verbindung **22a** dargestellt. Es zeigt sich, dass die grundsätzliche Positionierung in der Bindetasche unverändert bleibt, denn in der Umgebung des Stickstoffatoms ist ausreichend Raum für den kleinen Methyl-Substituenten vorhanden. Des Weiteren war das in **17a** an dieses Stickstoffatom gebundene Proton nicht an einer direkten Interaktion mit der Kinase beteiligt, sodass kein größerer Abfall der Aktivität zu erwarten war. Außerdem blieben die Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region über die Lactam-Gruppe ebenfalls erhalten.

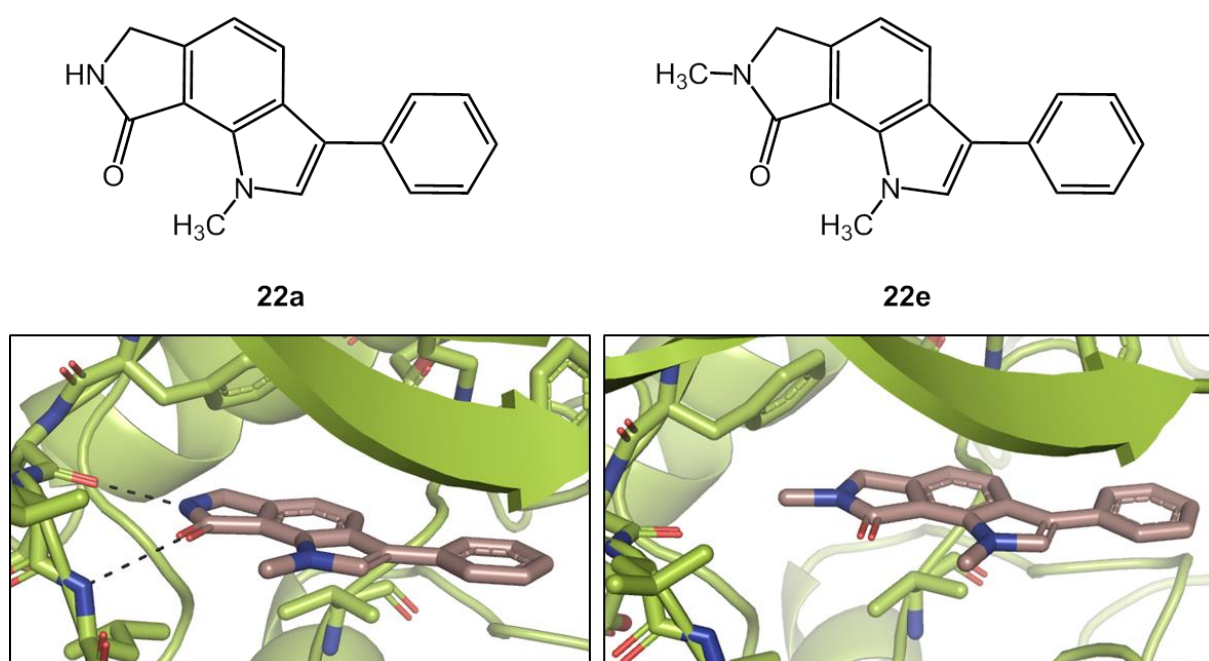


Abbildung 16: Vergleich der *docking*-Position des am Indol-Stickstoffatom methylierten 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Derivats (**22a**, links) mit der zweifach methylierten Verbindung **22e** (rechts); unterbrochene schwarze Line: Wasserstoffbrückenbindungen.

Eine veränderte Situation zeigt das in Abbildung 16 rechts dargestellte Resultat für die zweifach methylierte Verbindung **22e**. Neben diversen Orientierungen des Moleküls in der ATP-Bindetasche lieferte das *docking* auch eine dem bisher dominierenden Bindemodus ähnliche Position. Allerdings kommt es nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand, da die Verbindung nach der Methylierung beider Stickstoffatome keine Donator-Funktionen mehr enthält. Außerdem wurde die Entfernung der Carbonyl-Gruppe von der *hinge*-Region durch die veränderte Position in der Bindetasche zu groß, als dass eine Wechselwirkung zwischen beiden stattfinden könnte. Eine ähnliche Auswirkung war durch die Einführung einer Methylgruppe ausschließlich an dem Lactam-

Stickstoffatom zu beobachten. Es wurden keine Posen vorhergesagt, in denen es zu Wasserstoffbrückenbindungen mit der *hinge*-Region kam, vermutlich auch auf Grund der Distanz, die durch sterische Effekte der Methylgruppe zur *hinge*-Region geschaffen wurden. Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Vermutung ableiten, dass Substituenten am Indol-Stickstoffatom die Aktivität nicht verschlechtern, sondern genutzt werden könnten, um diese potentiell zu verbessern. Dagegen schien bereits bei der alleinigen Methylierung der N7-Position ein Aktivitätsverlust wahrscheinlich.

Für die weitere Analyse der Relevanz der Lactam-Struktur in **17a** für die Affinität der Inhibitoren zu den CLK-Kinasen sollte ein Vergleich des Bindemodus dieses Strukturelements mit dem der flexibleren Amide in den analogen offenkettigen Indol-7-carboxamiden **19** vorgenommen werden (Abbildung 17).

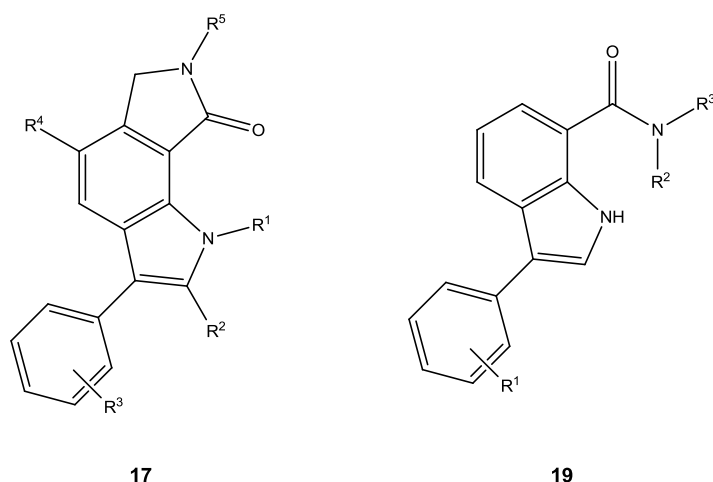


Abbildung 17: Grundkörper der Lactam-haltigen Substanzklasse **17** und der analogen offenkettigen Substanzklasse **19** im Vergleich.

Zu Beginn bestand die Hypothese, dass die offenkettige Amid-Funktion an Stelle der Lactam-Gruppe Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region ausbilden würde. Allerdings bestätigte sich diese Vermutung in den *docking*-Studien nicht. Wie in Abbildung 18 sichtbar, wurde für die Indol-7-carboxamide eine abweichende Orientierung in der Bindetasche vorhergesagt, in der das Amid Wechselwirkungen mit Aminosäuren in der Umgebung des DFG-Motivs eingeht. Im Fall des *N*-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamids **19h** wird eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoffatom des Amids und der Carbonsäure-Funktion des Aspartats (Asp325) aus dem DFG-Motiv vorhergesagt. Die Interaktion mit der *hinge*-Region erfolgt hier über die Methoxy-Gruppe in 3-Position des Phenyl-Substituenten und dem Amid-NH der

gk+3-Aminosäure Leucin (Leu244). Hydrophobe Wechselwirkungen können zwischen dem Indol-Ringsystem und dem lipophilen Val324 beobachtet werden. Weiterhin befindet sich der Benzyl-Substituent in einer Position, die eine *edge-to-face*-Wechselwirkung mit dem Phenylalanin (Phe172) aus der P-Schleife ermöglicht.

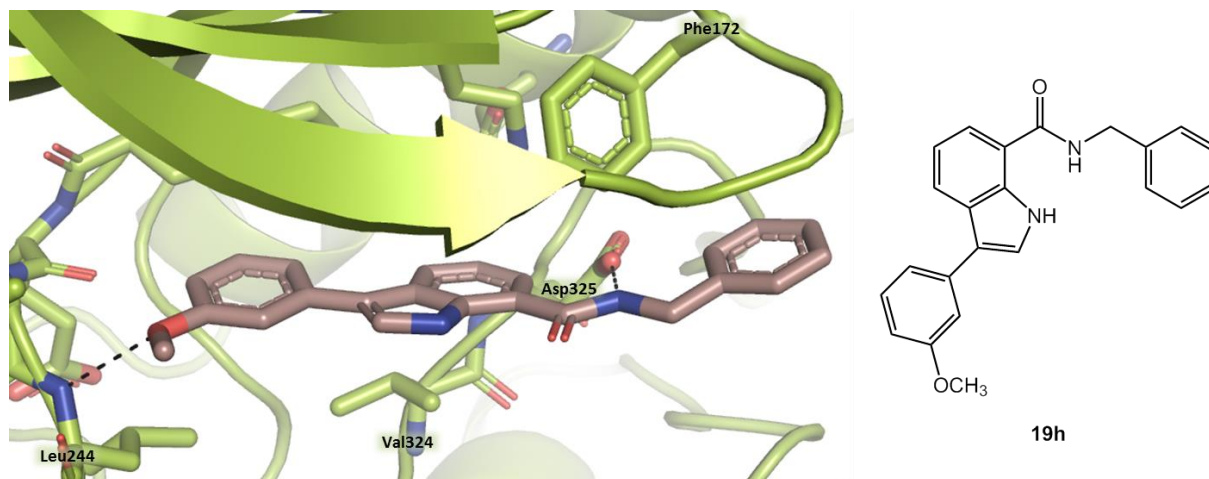
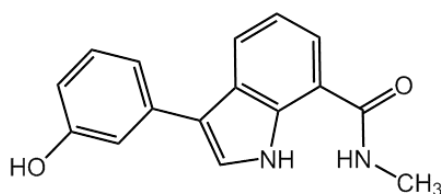


Abbildung 18: Präferierte *docking*-Pose des *N*-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamids **19h** in CLK1 (PDB: 1Z57); Unterbrochene schwarze Linie: Wasserstoffbrücken.

Begründet in der Flexibilität des nicht durch die Einbindung in ein Ringsystem restringierten Amids, ergaben die *docking*-Untersuchungen jedoch insgesamt ein weniger eindeutiges Bild als dies bei den 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen **17** der Fall war. An Hand des 3-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-methyl-1*H*-indol-7-carboxamids **19f** ist diese Vielfalt der vorhergesagten Bindungsmodi in Abbildung 19 dargestellt. Die in A und B gezeigten Posen können als vergleichbar mit dem für das Benzylamid **19h** vorhergesagten Bindemodus betrachtet werden, denn das zentrale Indol-Strukturelement ist in gleicher Weise ausgerichtet. Dadurch kommt es in beiden Fällen zu einer Wasserstoffbrücke zu der *gk*+1 Aminosäure (Glu242), sowie bei B zusätzlich zu der *gk*+3 Aminosäure (Leu244), wobei dieser Unterschied auf die Rotation des 3-Hydroxyphenyl-Substituenten zurückzuführen ist. Das Methylamid bildet in der Pose A eine Wasserstoffbrücke zu Asn293 und in Pose B zu Glu292, sodass die grundsätzliche Orientierung in der ATP-Bindetasche bei den Verbindungen **19h** und **19f** sehr ähnlich ist. Dagegen weichen die Posen C und D deutlicher ab. Eine Interaktion mit der *hinge*-Region in der Pose C ist zwischen der Carbonyl-Funktion von Leu244 und dem Methylamid erkennbar, das heißt, dass eine Rotation des Moleküls in der Bindetasche stattgefunden hat. Die Hydroxyl-Gruppe interagiert nun mit dem Aspartat des DFG-Motivs. In der Pose D ist eine weitere Rotation zu beobachten, die zur Folge hat, dass eine Bindung

an die *hinge*-Region nicht mehr möglich ist. Wasserstoffbrücken werden aber über die Methylamid-Funktion mit Asp250 am Eingang der Bindetasche, sowie mit Glu206 und Lys191, welche eine konservierte Salzbrücke miteinander bilden, eingegangen.



19f

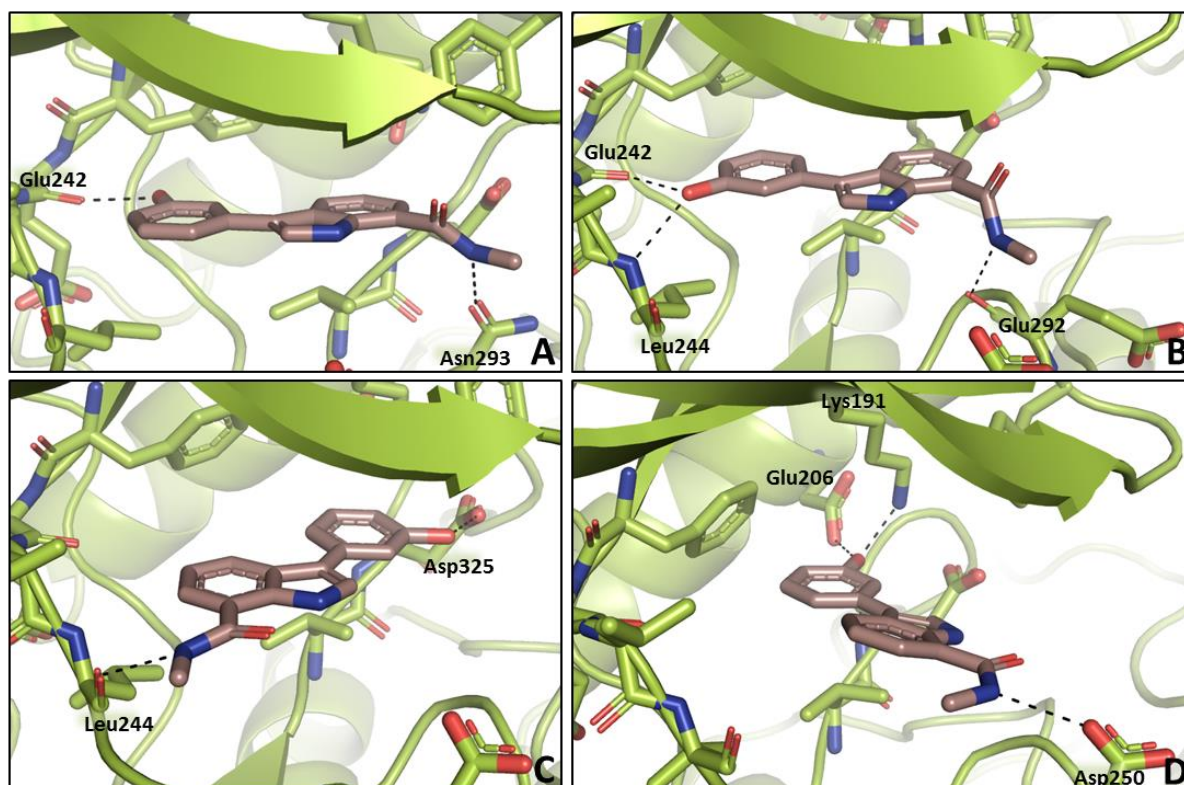


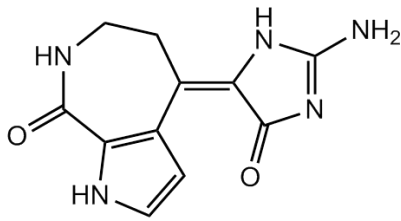
Abbildung 19: Verschiedene in *docking*-Studien für Verbindung **19f** vorhergesagte Bindemodi in CLK1. Unterbrochene schwarze Linie: Wasserstoffbrücken.

Obwohl die Indol-7-carboxamide **19** im Vergleich zu dem Lactam-haltigen tricyclischen System **17** eine erhöhte Flexibilität zeigen, lässt sich ein bevorzugter Bindemodus charakterisieren, der in den *docking*-Studien für alle Derivate vorhergesagt wurde (Abbildung 18 und Abbildung 19A+B). Als Element zur *hinge*-Bindung dient dort nicht die Amid-Struktur, sondern ein Wasserstoffbrücken-Akzeptor oder -Donator an dem Phenyl-Rest in 3-Position des Indol-Grundkörpers. Die Amid-Bindung ist dagegen zur Lösemittel-zugewandten Seite hin orientiert und bildet dort je nach exakter Positionierung Wasserstoffbrücken zu unterschiedlichen Aminosäuren aus. Vorgeschlagene Bindemodi ohne

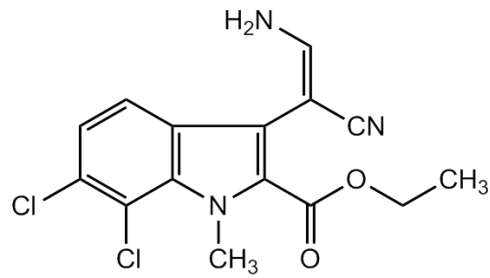
Interaktion mit der *hinge*-Region oder mit geringer Ausfüllung der ATP-Bindetasche sind hingegen als unwahrscheinlicher anzusehen.

Bindemodi co-kristallisierter Inhibitoren in CLK1

Eine Bindemodus-Analyse des Inhibitors Debromohymenialdisin (DBH) **7**, der ursprünglich in der für das *docking* verwendeten Kristallstruktur (PDB: 1Z57) enthaltenen war, zeigt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die mit denen der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one vergleichbar sind (Abbildung 20A+B). Über das Lactam-Strukturelement sind Wasserstoffbrücken zu der *gk*+1 (Glu242) und zu der *gk*+3-Aminosäure (Leu244) zu beobachten. Indirekt kommt es zu einer weiteren Interaktion zwischen Leu244 und dem Pyrrol-Stickstoffatom, vermittelt über ein Wassermolekül. Im Gegensatz zu den Vertretern der Verbindungsklasse **17** nutzt DBH auch den Bereich der Bindetasche, der an die α C-Helix, das konservierte Lysin und das DFG-Motiv angrenzt. So entstehen durch ein Netz von Wasserstoffbrücken, in das ein weiteres Wassermolekül einbezogen ist, Interaktionen des 2-Amino-1*H*-imidazol-5(4*H*)-ons mit Glu206 aus der α C-Helix und Asp325 aus dem DFG-Motiv. In Abbildung 20B ist die Raumausfüllung des Inhibitors in der Bindetasche mit Hilfe der Oberflächen von Protein und Ligand dargestellt. Es wird deutlich, dass die gesamte Tasche für die Interaktion genutzt wird und dass hydrophile Strukturelemente des Inhibitors auf hydrophile Bereiche des Proteins treffen, sodass es zu günstigen Wechselwirkungen kommt. In einer weiteren Co-Kristallstruktur (PDB: 2VAG) ist der Inhibitor KH-CB19 **8** in der ATP-Bindetasche der CLK1 gebunden (Abbildung 20C+D). Anders als bei den bisher beschriebenen Verbindungen findet die Interaktion mit der *hinge*-Region hier über eine Halogenbindung zwischen dem Chlor-Substituenten in 6-Position des Inhibitors und dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Glu242 (*gk*+1) statt. Ebenso wie im Fall des DBH befindet sich ein Wassermolekül nahe der Salzbrücke zwischen Lys191 und Glu206, welches indirekte Wasserstoffbrückenbindungen von diesen Aminosäuren zu der Nitril-Gruppe ermöglicht.



7



8

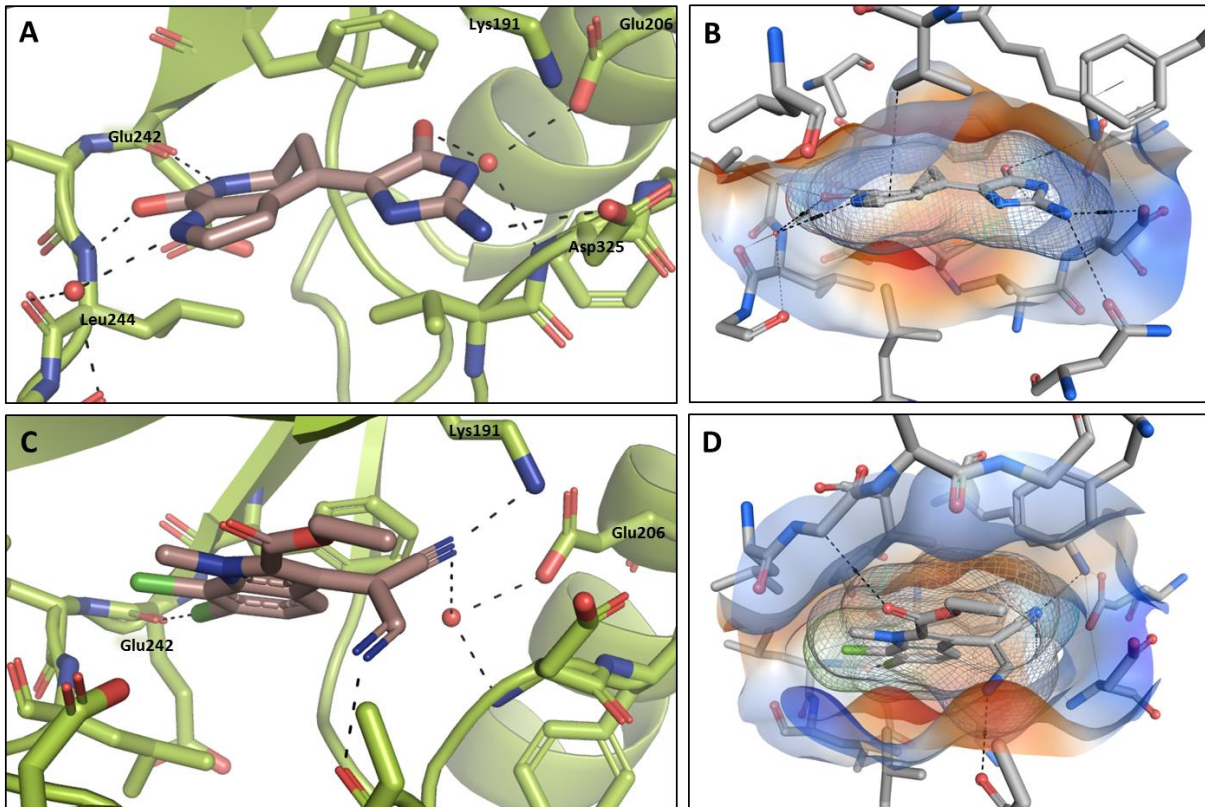
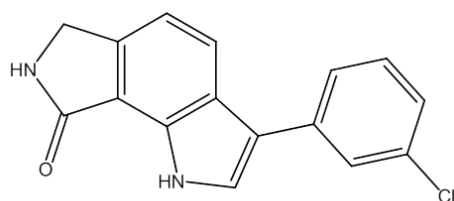


Abbildung 20: Bindemodi zweier co-kristallisierter Inhibitoren in der ATP-Bindetasche von CLK1. **A+B:** Debromohymenialdisin **7** (PDB: 1Z57); **C+D:** KH-CB19 **8** (PDB: 2VAG); *orange:* hydrophobe Oberfläche, *blau:* hydrophile Oberfläche; *unterbrochene schwarze Linie:* Ligand-Protein-Interaktion.

Außerdem kann eine Interaktion zwischen der Amino-Gruppe von KH-CB19, die in der Kristallstruktur als das tautomere Imin dargestellt ist, und dem Carbonyl-Sauerstoffatom aus der Amid-Bindung von Glu292 beobachtet werden. Da die Position der Seitenkette dieses Glutamats in der Kristallstruktur jedoch nicht vollständig definiert ist, kann keine genaue Aussage über die Bindungsverhältnisse in diesem Bereich der ATP-Bindetasche getroffen werden. In der Darstellung der Oberflächen (Abbildung 20D) zeigt sich eine umfassende Belegung der Bindetasche durch den Inhibitor.

Vergleich der Bindungsmodi in verschiedenen CLK-Isoformen

Innerhalb der CLK-Familie lassen sich Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Isoformen sowohl bei literaturbekannten Inhibitoren als auch bei den 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen feststellen. Zumeist werden CLK1 und CLK4 besonders stark und durch ähnliche Konzentrationen gehemmt, während die inhibitorische Aktivität der Verbindungen an der CLK2 im Vergleich meist schwächer ausgeprägt ist. Am stärksten unterscheidet sich von den übrigen Isoformen die Wirkung der Inhibitoren auf die CLK3, denn hier wird oft eine um mehrere Zehnerpotenzen schwächere Aktivität beobachtet. Bei Betrachtung der ATP-Bindetasche zeigt sich dennoch, dass sich diese nur in geringem Ausmaß von der anderen Isoformen unterscheidet. Die wichtigsten Unterschiede zwischen CLK1 und CLK3 stellen der Austausch von Val324 in CLK1 gegen Ala319 in CLK3 am Boden der Bindetasche und der Austausch von Asp250 in CLK1 gegen Glu245 in CLK3 in der α -Helix am Eingang der Bindetasche dar (Abbildung 21). Da Alanin im Vergleich zu Valin eine kürzere Seitenkette besitzt, ist der Raum in diesem Bereich nahe des DFG-Motivs vergrößert und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem dort positionierten 3-Phenyl-Rest der Inhibitor-Moleküle sind verringert. Im Gegensatz dazu ist die Seitenkette des Glutamats (Glu245) in CLK3 raumerfüllender als die des Aspartats (Asp250) in CLK1, jedoch ist die Carbonsäure-Funktion in der betrachteten Kristallstruktur (PDB: 2WU7)³¹ in Richtung Lösemittel orientiert, sodass die Interaktion mit in der Bindetasche gebundenen Inhibitoren erschwert wird. Der umgekehrte Fall ist bei Glu287 zu beobachten, welches mit der P-Schleife der CLK3 eine Säule am Eingang der Bindetasche ausbildet. In CLK1 ist das äquivalente Glu292 dagegen zum Medium hin ausgerichtet und beschränkt den Zugang zur Bindetasche dadurch nicht, stellt allerdings auch keinen geeigneten Interaktionspartner für die Verbindungen der Klasse **17** dar.



17c

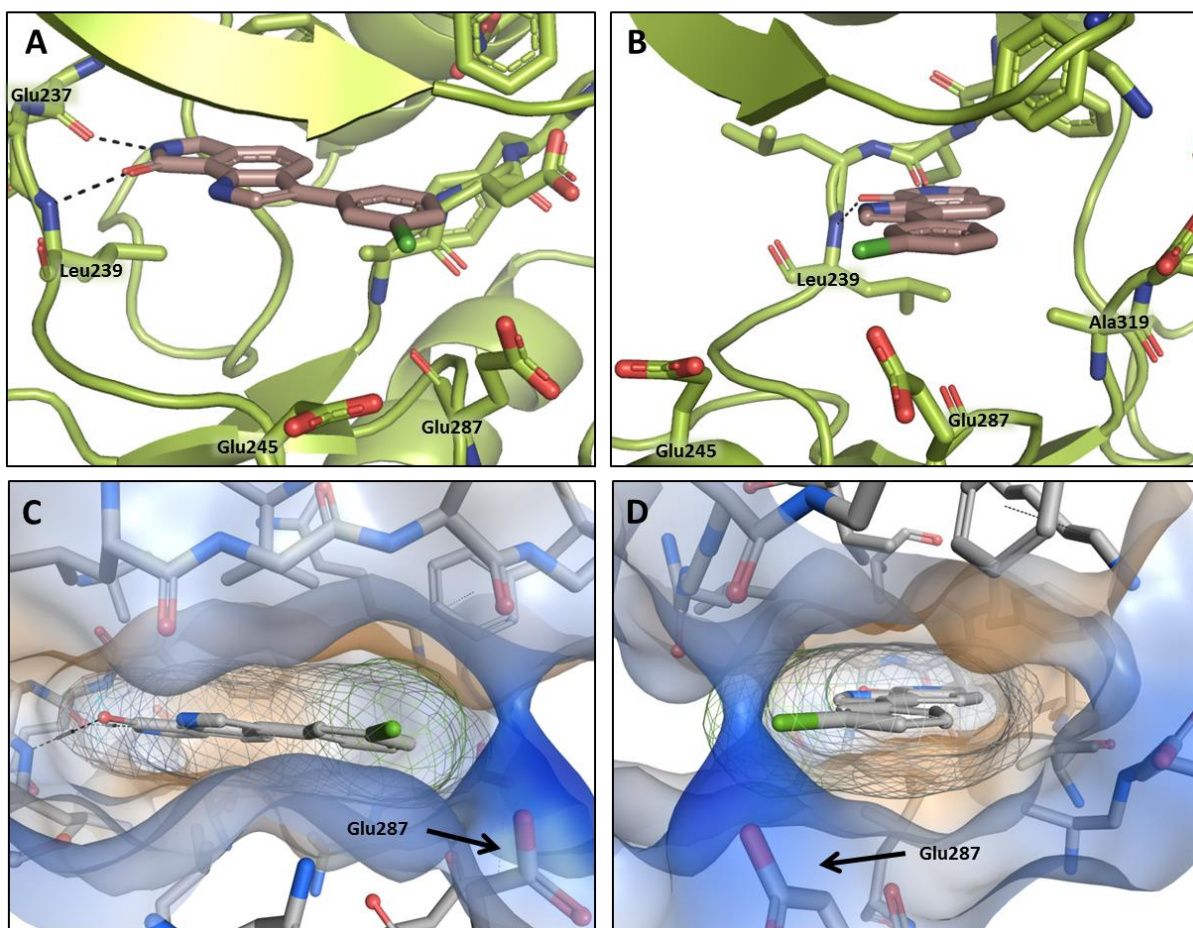


Abbildung 21: Docking von Verbindung **17c** in CLK3 (PDB: 2WU7). **A:** Darstellung der Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region; unterbrochene schwarze Linie: Wasserstoffbrücken; **B:** Positionierung des 3-Chlorphenyl-Restes am Eingang der Bindetasche; **C+D:** Darstellung der Liganden- und Bindetaschen-Oberfläche: orange: hydrophobe Oberfläche, blau: hydrophile Oberfläche.

In einigen Protozoen wurden Kinasen identifiziert, die sich als homolog zu denen der CLK-Familie herausstellten. So wurde unter anderem in *Plasmodium falciparum* die *Pf*LAMMER-Kinase oder *Pf*CLK1 entdeckt und durch Erstellung einer Röntgenkristallstruktur charakterisiert (PDB: 3LLT).⁶¹ Obwohl es im Vergleich zur humanen CLK1 zum Austausch einiger Aminosäuren in der ATP-Bindetasche kam, zeigen die *docking*-Studien dennoch den gleichen Bindemodus für die Verbindungsklasse der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17** (Abbildung 22). Trotz des Prolins (Pro632) an der *gk*+2-Position ist weiterhin die Ausbildung von Wasserstoffbrücken über die Lactam-Struktur zur *hinge*-Region (*gk*+1 und *gk*+3)

möglich. Ebenso lässt das anstelle des Val324 (CLK1) vorhandene voluminösere Ile719 (*Pf*CLK) in unmittelbarer Nähe des DFG-Motivs nach wie vor ausreichend Raum für den Indol-Grundkörper und den in 3-Position vorhandenen Phenyl-Substituenten. Durch die Rotation der Phenylalanin-Seitenkette in der P-Schleife (Phe563) in Richtung Lösemittel wird die ATP-Bindetasche in diesem Bereich vergrößert und das konservierte Lysin (Lys581) für Interaktionen mit Liganden leichter zugänglich. Insgesamt ist die Bindetasche im Vergleich zur humanen CLK1 weiter zum Medium hin geöffnet, wodurch gebundene Inhibitoren stärker exponiert sind.

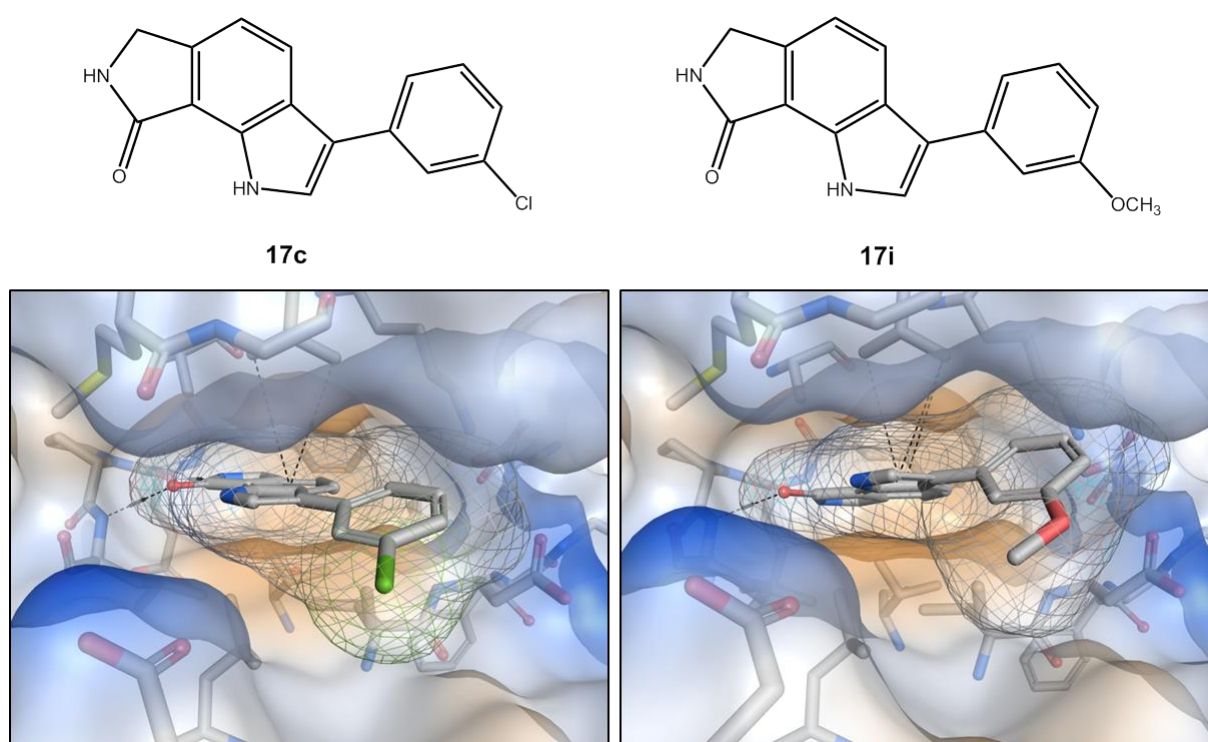


Abbildung 22: Darstellung der Oberfläche der ATP-Bindetasche in der *Pf*CLK1 (PDB: 3LLT); *links: docking* des inaktiven 3-Chlorphenyl-Derivats **17c**; *rechts: docking* des aktiven 3-Methoxyphenyl-Derivats **17i**; *orange*: hydrophobe Oberfläche, *blau*: hydrophile Oberfläche; *unterbrochene schwarze Linie*: Ligand-Protein-Interaktion.

In-vitro Testungen an *Pf*CLK1 ergaben, dass 3-(3-Chlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **17c** keine inhibitorische Aktivität aufwies, während 3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **17i** im einstellig mikromolaren Bereich zur Hemmung der Kinase führte. In Abbildung 22 sind *docking*-Posen der beiden Verbindungen in *Pf*CLK1 im Vergleich dargestellt. Es wird deutlich, dass die Substituenten des Phenyl-Restes in Richtung Lösemittel weisen, was insbesondere im Fall des lipophileren Chloratoms ungünstig ist. Während der Methoxy-Substituent in eine Senke am Eingang der ATP-Bindetasche hineinragt, ist der Chlor-Substituent zu klein dafür, wodurch die hydrophoben

Wechselwirkungen im letzteren Fall geringer sind. Trotz der genannten Hinweise ist der Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Verbindungen an Hand des *dockings* nicht umfassend erklärbar.

Docking-Studien an DYRK-Kinasen zur Erklärung der Inhibitor-Selektivität

Im Zusammenhang mit der Anwendbarkeit der Inhibitoren für biologische Untersuchungen ist auch die Selektivität der Verbindungen gegenüber verwandten humanen Kinasen wie den DYRKs entscheidend. Größere Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zwischen den ATP-Bindetaschen von CLK1 und DYRK1A lassen sich neben dem Austausch von der *gk*+2-Aminosäure Leucin in CLK1 zu Methionin in DYRK1A nicht finden. Trotz der relativ ausgeprägten Homologie in diesem Bereich sind Unterschiede in der Raumstruktur der beiden Kinasen vorhanden (Abbildung 23). So ist die ATP-Bindetasche der CLK1 im Vergleich zur DYRK1A etwas kleiner und an der Lösemittel-zugewandten Seite teilweise geschlossen (Abbildung 23A+B). Im Gegensatz dazu bietet die DYRK1A an dieser Stelle mehr Raum für größere Liganden und schirmt diese durch eine offenere Bindetasche weniger vom Lösemittel ab (Abbildung 23C+D). Das 3-(3-Chlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **17c** nimmt nach der *docking*-Vorhersage durch GOLD in CLK1 und DYRK1A die gleiche Position in der Bindetasche ein. Es werden Wasserstoffbrücken von der Lactam-Struktur zur hinge-Region ausgebildet und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem zentralen Indol-Ringsystem und lipophilen Aminosäureseitenketten oberhalb und unterhalb des Grundkörpers ermöglicht.

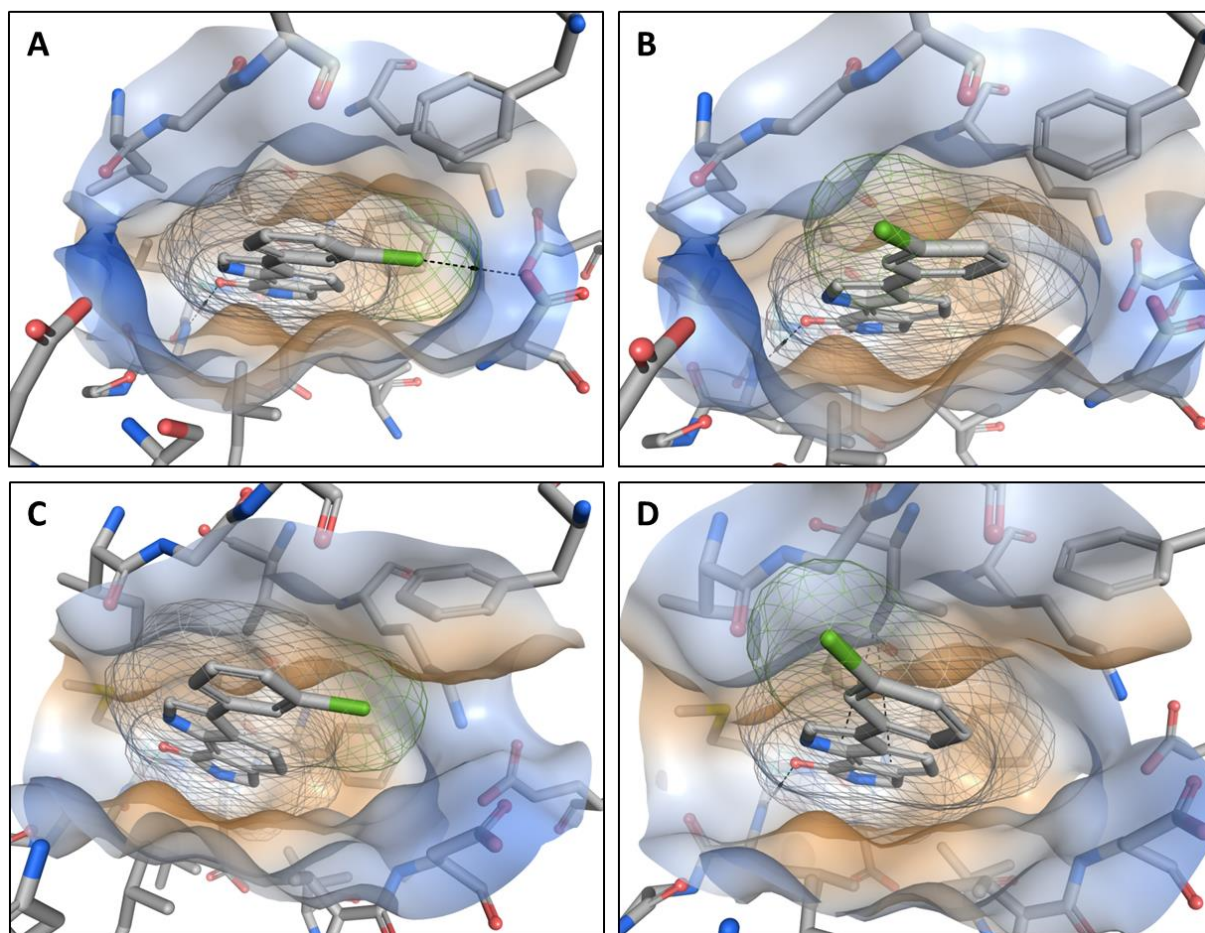
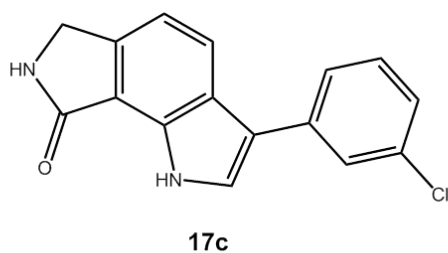


Abbildung 23: Darstellung der ATP-Bindetaschen-Oberfläche und des gedockten Inhibitors **17c** in CLK1 (PDB: 1Z57) und DYRK1A (PDB: 3ANQ)³⁴ im Vergleich. **A+B:** Zwei *docking*-Posen von **17c** in CLK1, die sich in der Rotation des 3-Chlorphenyl-Restes unterscheiden. **C+D:** Zwei *docking*-Posen von **17c** in DYRK1A, die sich auf gleiche Weise wie bei A und C in der Rotation des 3-Chlorphenyl-Restes unterscheiden; *blau*: hydrophile Oberfläche, *orange*: hydrophobe Oberfläche, *unterbrochene schwarze Linie*: Ligand-Protein-Interaktion.

In Abbildung 23A ist der Chlor-Substituent in Richtung des Aspartats des DFG-Motivs von CLK1 ausgerichtet, sodass in diesem Bereich eine schwache Halogen-Bindung angenommen werden kann.⁶² Es kommt dabei zu einer Interaktion zwischen dem Carboxyl-Sauerstoffatom von Asp325 und dem sogenannten σ -hole in der Elektronenhülle des Chlor-Substituenten, bei dem es sich um einen Bereich positiver Partialladung in der ansonsten negativ geladenen Oberfläche handelt (Abbildung 24). BOECKLER *et al.* beschrieben, welche geometrischen Voraussetzungen für die Ausbildung einer Halogen-Bindung gegeben sein müssen. Im

optimalen Fall beträgt der $C_{Ar}-Cl\cdots O$ -Bindungswinkel 180° , jedoch ist noch bis zu einem Winkel von ca. 140° ein positiver Effekt auf die Affinität bemerkbar. Der Dieder-Winkel ist bei einem Sauerstoffatom als Bindungspartner weniger relevant, da dieses eine räumlich ausgedehnte negativ geladene Oberfläche besitzt. Dagegen ist der Abstand zwischen den Bindungspartnern wichtig. Bei einer Distanz kleiner als 2.5 \AA kommt es zu einem starken Abfall der Bindungsenergie, vermutlich auf Grund der Überschneidung des negativ geladenen Gürtels des Halogens mit den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffatoms. Andererseits ist bei einer Distanz, die um 100 pm von dem optimalen Abstand abweicht, eine Reduktion der Bindungsenergie von ca. 50% zu beobachten. Für Chlor-Halogenbindungen beträgt die ideale Distanz 312 pm . Sind optimale geometrische Voraussetzungen gegeben, trägt eine über Chlor vermittelte Halogenbindung mit ca. 2 kJ/mol zur Bindungsenergie bei.⁶² Im vorliegenden Fall ist von einem geringeren Beitrag auszugehen, da die Geometrie mit einer Bindungslänge von 368 pm und einem $C_{Ar}-Cl\cdots O$ -Bindungswinkel von 144.3° von den idealen Voraussetzungen abweicht.

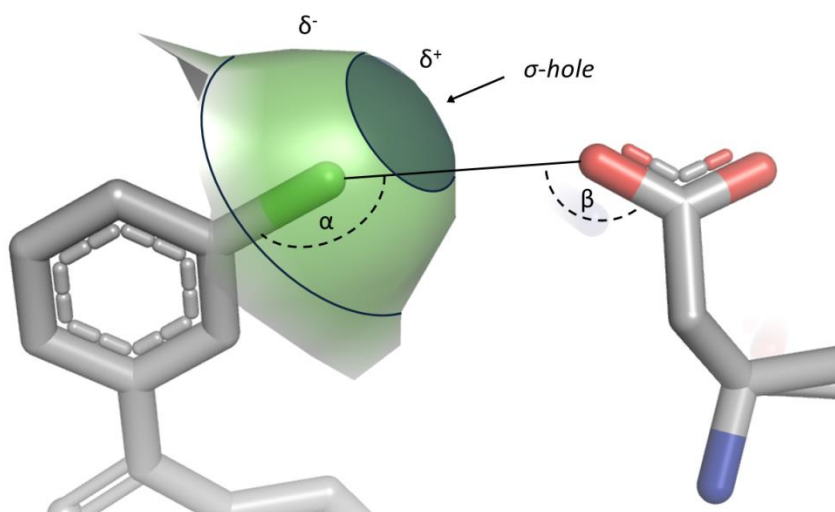


Abbildung 24: Halogen-Bindung (3.68 \AA) zwischen dem Chlor-Atom in **17c** und dem Carboxyl-Sauerstoffatom des Asp325 in CLK1. α : $C_{Ar}-Cl\cdots O$ -Winkel = 144.3° , β : $Cl\cdots O=C$ -Winkel = 144.14° , δ^+ : positive Partialladung, δ^- : negative Partialladung.

Nichtsdestotrotz bleibt grundsätzlich die Möglichkeit zur Ausbildung einer Halogenbindung erhalten. Diese ist bei dem in Abbildung 23B dargestellten Rotamer nicht gegeben, bei dem sich der Chlor-Substituent in der Nähe des Asp250 und zum Lösemittel hin orientiert befindet. Bei Betrachtung der Situation in der DYRK1A (Abbildung 23C und D) wird deutlich, dass die Exposition des Liganden gegenüber dem Lösemittel auf Grund der weiter geöffneten Bindetasche stärker ausgeprägt ist. Dadurch gelangt der lipophile Chlor-

Substituent bei den beiden gezeigten Konformationen des 3-Phenyl-Restes in größerem Ausmaß in Kontakt mit dem hydrophilen Umgebungsmedium. Außerdem gestattet der Abstand des Liganden zum DFG-Motiv keine Halogen-Bindung zu der Carbonsäure-Funktion des Aspartats. Obwohl sich einige Unterschiede in der Interaktion der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17** mit CLKs und DYRKs identifizieren lassen, bleibt die Begründung der beobachteten Aktivitätsunterschiede zwischen diesen schwierig.

Fazit der *docking*-Studien

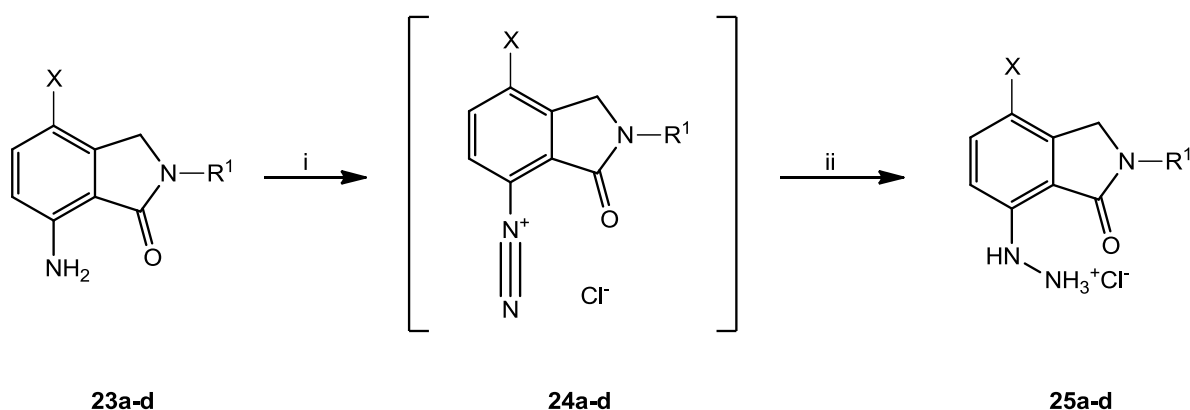
Für die Planung der Synthese von Derivaten der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17** ließen sich aus den *docking*-Studien an der CLK1-Kristallstruktur Hinweise ableiten. So zeigte sich, dass eine Variation des Substitutionsmusters an dem Phenyl-Rest in 3-Position ohne Beeinträchtigung der Bindung an die *hinge*-Region möglich ist. Daher bot sich die Derivatisierung an dieser Position an, um den Einfluss verschiedenartiger Substituenten experimentell zu untersuchen. Weiterhin wurde sichtbar, dass die Grundstruktur lediglich den Teil der Bindetasche nahe der *hinge*-Region besetzt und durch eine Erweiterung des Moleküls mit Substituenten in angemessener Größe zusätzlicher Raum in der ATP-Bindetasche genutzt werden könnte. Es wurde deutlich, dass die Lactam-Struktur als zentrales Element für die Bindung an die Kinase dient und eine Derivatisierung an dieser Position somit wahrscheinlich einen starken Einfluss auf die inhibitorische Aktivität haben wird. Im Gegensatz dazu gilt dies nicht für die Substitution am Indol-Stickstoffatom, das nicht direkt an der Interaktion mit der Bindetasche beteiligt ist und daher die Möglichkeit zur Modifikation bietet. Im Fall der Indol-7-carboxamide **19** könnte eine Variation des Amid-Substituenten zur Erschließung weiterer Interaktionsmöglichkeiten am Eingang der Bindetasche führen. Bei einer Variation des Substitutionsmusters am 3-Phenyl-Ring spielt vermutlich die Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeit eine wichtige Rolle für die Aktivität der Verbindungen, da über dieses Strukturelement bei **19h** eine Bindung zur *hinge*-Region ausgebildet wird.

4 Synthese

Als zentraler Bestandteil der Darstellung des Grundkörpers **17** kann die Fischer-Indol-Synthese betrachtet werden, in der aus einem Arylhydrazin und einer Carbonyl-Verbindung das indolhaltige tricyclische System aufgebaut wird.⁶³ Eine Variation des Substitutionsmusters konnte sowohl durch die Verwendung verschiedener Edukte als auch durch nachträgliche Einführung unterschiedlicher Substituenten erreicht werden.

4.1 Synthese von 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid und Derivaten (**25**)

Ausgehend von dem 7-Aminoisoindolinon **23a** oder von seinen substituierten Derivaten **23b-d** wurde durch Diazotierung mit Natriumnitrit zunächst das Diazonium-Salz **24a-d** synthetisiert. Ohne das Zwischenprodukt zu isolieren, wurde eine Reduktion mittels Zinn(II)chlorid durchgeführt, sodass die Hydrazine der Struktur **25a-d** erhalten wurden (Schema 4-1).⁶⁴



- a** $R^1 = \text{H}, X = \text{H}$
- b** $R^1 = \text{CH}_3, X = \text{H}$
- c** $R^1 = \text{H}, X = \text{Br}$
- d** $R^1 = \text{H}, X = \text{Cl}$

Schema 4-1: Diazotierung der aromatischen Amine **23**, sowie Reduktion der Diazoniumchloride **24**; i: NaNO_2 , HCl (37%), 20 min, $< 0^\circ\text{C}$, ii: $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, HCl (37%), 30 min, $< 0^\circ\text{C}$, Produkt als Rohprodukt weiterverwendet.

Die Entfernung des während der Reaktion entstandenen Zinn(IV)chlorids aus dem Rohprodukt gelang durch das Lösen von **25a** in Wasser unter Erhitzen der Mischung zum Reflux. Durch den Austritt von Chlorwasserstoffgas während dieses Prozesses kam es zu einer Erhöhung des pH-Wertes, wodurch Zinn-Komplexe präzipitierten. Der entstandene

Niederschlag konnte durch Zentrifugation abgetrennt werden, während das Produkt in Lösung blieb und als Monohydrat isoliert werden konnte. Eine angefertigte Röntgenkristallstruktur widerlegte die Möglichkeit der Bildung von Zinn-Doppelsalzen und bestätigte die Abtrennung des Metallsalzes von dem Produkt. Dagegen konnte gezeigt werden, dass das Produkt als Hydrochlorid anfällt und sich ein Monohydrat ausbildet, wobei sowohl das Chlorid-Ion als auch das Wassermolekül an dem terminalen positiv geladenen Stickstoffatom lokalisiert sind (Abbildung 25).

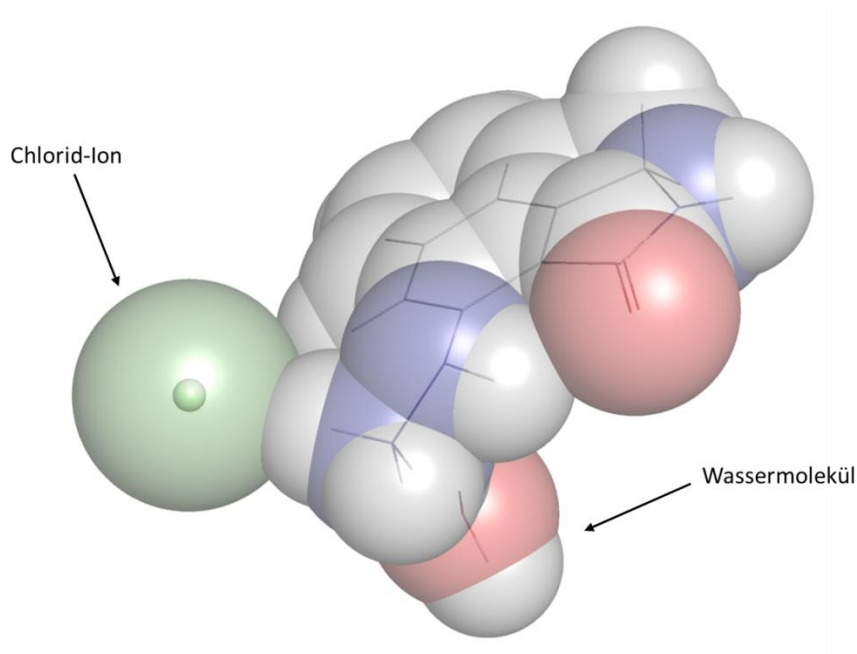
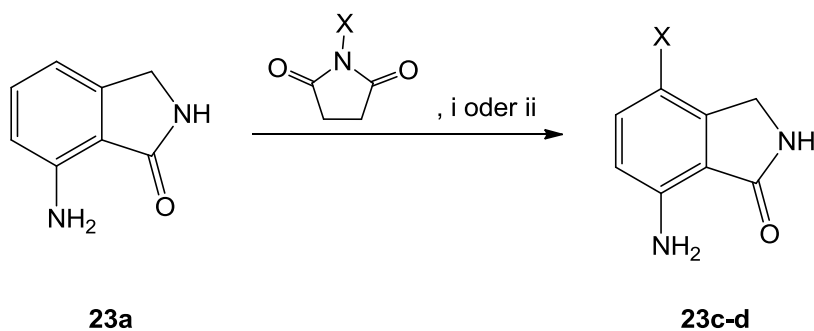


Abbildung 25: Die Kristallstruktur von **25a** zeigt die Bildung eines Hydrochlorid-Hydrats.

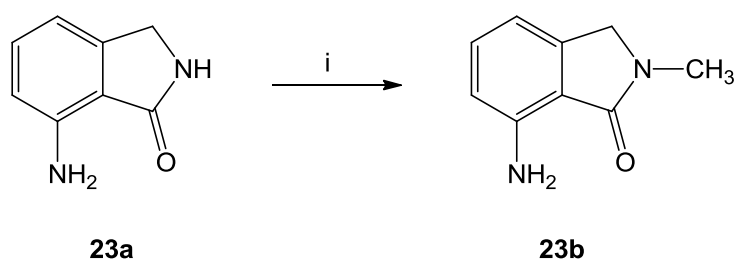
Um zu den in Position 4 halogenierten Derivaten des 7-Aminoisindolinons zu gelangen, wurde **23a** mit dem entsprechenden *N*-Halogensuccinimid in Dichlormethan oder Acetonitril umgesetzt (Schema 4-2).



Schema 4-2: Halogenierung von **23a** mit Succinimiden. i: X = Br: CH₂Cl₂, - 8 °C, 1 h, 78%; ii: X = Cl: Acetonitril, 60 °C → reflux, 2 h, 81%.^{65, 66}

Der positive mesomere Effekt der aromatischen Amino-Gruppe führt dazu, dass elektrophile Substitutionen an dem aromatischen System bevorzugt in *ortho*- oder *para*-Stellung der Amino-Funktion stattfinden. In der Reaktion mit Bromsuccinimid wurde hauptsächlich das gewünschte, in *para*-Stellung substituierte Produkt erhalten, wohingegen bei der Verwendung von Chlorsuccinimid ein erheblicher Anteil des *ortho*-substituierten Derivats entstand. In der folgenden Diazotierungsreaktion wurde dennoch das Rohprodukt eingesetzt und das gewünschte Produkt erst im Anschluss isoliert.

Eine selektive Methylierung des 7-Aminoisoindolinons gelang in getrocknetem Tetrahydrofuran unter Verwendung von Kalium-*tert*-butylat als Base (Schema 4-3).⁶⁷ Bei Versuchen, die Methylgruppe erst nach dem Aufbau des Indolgrundkörpers der Verbindung **17a** einzuführen, wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen neben der Alkylierung des Lactam-Stickstoffs ebenfalls eine Alkylierung des Indol-Stickstoffs beobachtet.



Schema 4-3: Selektive Methylierung des Lactamstickstoffs in Verbindung **23a**; i: THF, KO^tBu, RT, 24 h, 55.3%.

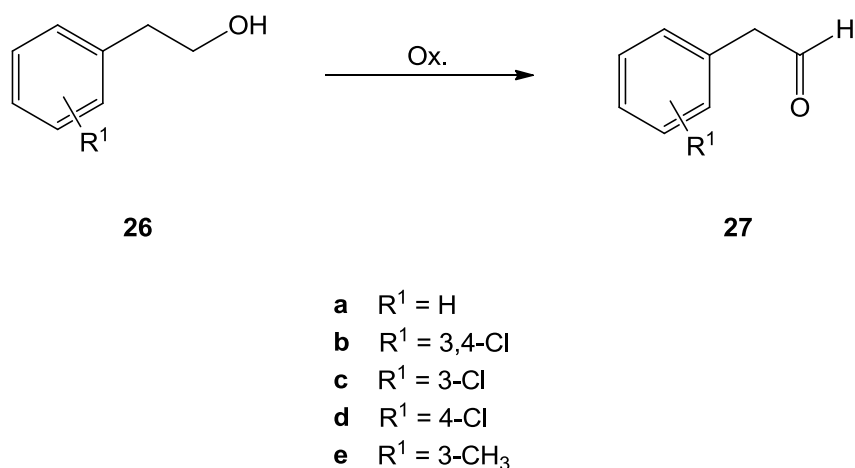
Die nach Schema 4-2 und Schema 4-3 dargestellten Verbindungen **23b-d** wurden ebenso wie das unsubstituierte 7-Aminoisoindolinon **23a** diazotiert und zu den jeweiligen Hydrazinen reduziert (Schema 4-1).

4.2 Versuche zur Synthese von Phenylacetaldehyden (27)

Für die Darstellung von Aldehyden im Allgemeinen steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, wobei die grundsätzliche Schwierigkeit darin besteht, den korrekten Oxidationsstatus zu erhalten. Wird eine Oxidation der entsprechenden primären Alkohole durchgeführt, so kann es leicht zu der unerwünschten Bildung von Carbonsäuren kommen. Sollen dagegen Carbonsäuren reduziert werden, so können Alkohole an Stelle der Carbonyl-Verbindungen entstehen. Aus diesem Grund werden Oxidations- bzw. Reduktionsmittel benötigt, deren Aktivität auf die gewünschte Transformation beschränkt bleibt. Andernfalls

müssen die sonstigen Reaktionsbedingungen derart angepasst werden, dass bevorzugt der Aldehyd gebildet wird.

Um eine geeignete Methode zur Darstellung verschiedener Phenylacetaldehyde für die Fischer-Indol-Synthese zu entwickeln, wurde die Oxidation von Phenylethylalkoholen mittels unterschiedlicher Oxidationsmittel getestet (Schema 4-4).



Schema 4-4: Oxidation von primären Phenylethylalkoholen zu Phenylacetaldehyden mit Hilfe verschiedener Oxidationsmittel.

2-Iodoxybenzoesäure (IBX)

Ebenso wie das etwas länger etablierte Dess-Martin-Periodinan (DMP) **28**, gehört IBX **29** zu den hypervalenten Iod-Verbindungen, die als milde Oxidationsmittel gelten (Abbildung 26). Auf Grund der Explosionsgefahr, die von ihnen während des Erhitzens oder bei Stößen ausgeht, werden die Reagenzien aber oft in Kombination mit Stabilisatoren eingesetzt, deren Massenanteil im Fall des IBX über 50% beträgt. Es werden zu diesem Zweck beispielsweise Benzoesäure und Isophthalsäure eingesetzt.^{68, 69}

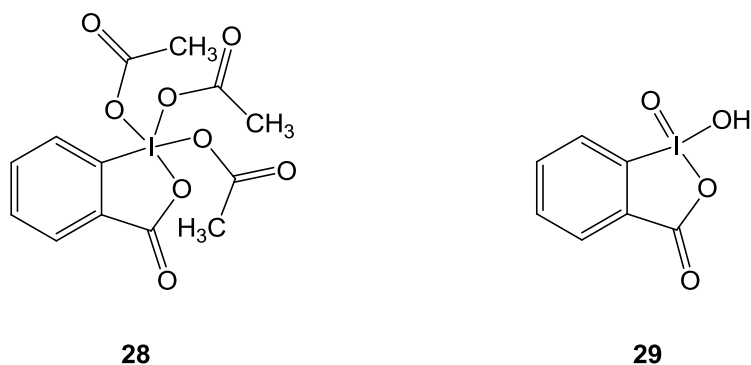
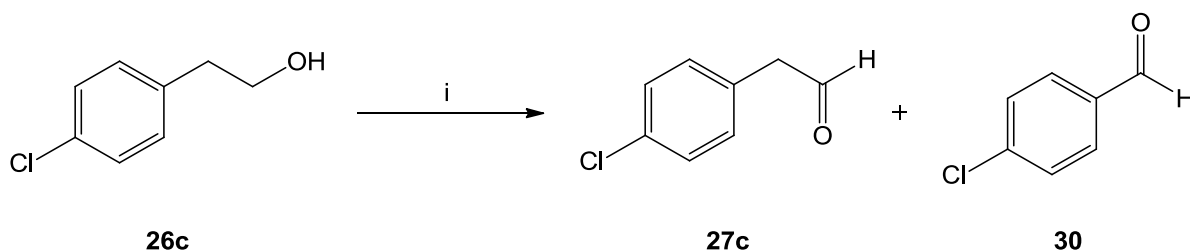


Abbildung 26: Dess-Martin-Periodinan (DMP, **28**) und 2-Iodoxybenzoesäure (IBX, **29**).

Im Vergleich zu DMP ist IBX stabil gegenüber Feuchtigkeit, sodass die Verwendung getrockneter Lösemittel nicht nötig ist. Nach einer Vorschrift von KIRSCH *et al.* sollte 4-Chlorphenylacetaldehyd aus 2-(4-Chlorphenyl)ethanol durch Oxidation mittels IBX dargestellt werden.⁷⁰ Allerdings zeigte eine NMR-spektroskopische Analyse, dass dabei ein Produktgemisch entstand, in dem die Zielstruktur nur mit einem geringen Anteil vertreten war.



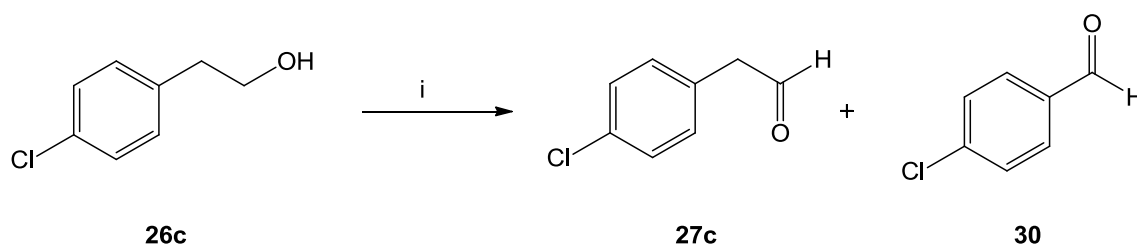
Schema 4-5: Oxidation von **26c** mit IBX führte zur Bildung eines Gemisches aus dem Phenylacetaldehyd- (**27c**) und dem Benzaldehyd-Derivat **30**; i: IBX, Acetonitril, Reflux, 2 h.

Im Produktgemisch dieser Reaktion lag 4-Chlorbenzaldehyd in 3-fach größerer Menge als das Acetaldehyd-Derivat vor. Eine eindeutige Identifizierung des Phenylacetaldehyds war dennoch an Hand der chemischen Verschiebung und der beobachtbaren Kopplung zwischen dem Aldehyd-Proton und der benachbarten Methylen-Gruppe möglich.⁷¹ SANTAGOSTINO *et al.* beschrieben, dass die Reaktion beschleunigt werden könnte, indem der Anteil an IBX gegenüber dem zu oxidierenden Material erhöht wird, ohne dass sich die Art der entstehenden Produkte verändert.⁶⁹ Eine Erhöhung des IBX-Überschusses führte jedoch zu einer weiteren Verschiebung des Produktverhältnisse hin zur Bildung des Benzaldehyd-Derivates.

Da durch IBX keine zufriedenstellende Herstellung von **27c** möglich war und die Isolation der Produkte durch den hohen Anteil stabilisierender Zusätze erschwert war, wurden weitere Verfahren zu dessen Gewinnung getestet.

Pyridiniumchlorochromat

Auch für die Verwendung von Pyridiniumchlorochromat (PCC) wurde die Bildung von Benzaldehyden durch Kettenabbau während der Oxidation von Phenylacetaldehyden beschrieben, wobei das Ergebnis von dem verwendeten Überschuss an PCC abhängig war (Schema 4-6). Dennoch gilt PCC als vielseitig anwendbares Oxidationsmittel, da es seine unterschiedlichen Wirkungen in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen entfaltet.^{72,73}



Schema 4-6: Oxidation von **26c** mit Pyridiniumchlorochromat (PCC); i: PCC; CH₂Cl₂, N₂, RT, 1 h.

In einer Versuchsreihe wurde das Stoffmengenverhältnis zwischen dem Edukt **26c** und dem Oxidationsmittel PCC variiert, sowie unterschiedliche Reaktionszeiten und Temperaturen getestet, um die Reaktionsbedingungen zu identifizieren, bei denen der Anteil des 3-Chlorphenylacetaldehyds im Produktgemisch maximal ist (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluss der Reaktionszeit, Temperatur und der Stoffmengenverhältnisse auf das Verhältnis zwischen 4-Chlorphenylacetaldehyd **27c** und 4-Chlorbenzaldehyd **30** im Produktgemisch. Alle Reaktionen wurden in getrocknetem Dichlormethan durchgeführt.

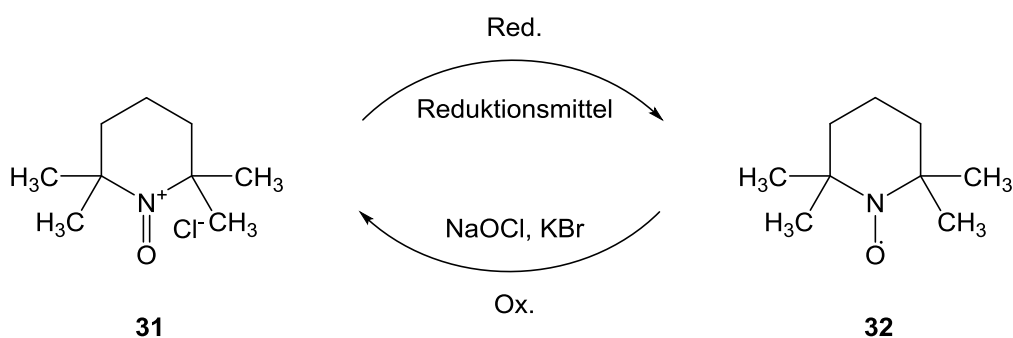
Stoffmenge 26c [mmol]	Stoffmenge PCC [mmol]	Reaktionszeit [h]	Temperatur [°C]	Verhältnis 27c : 30
1	1.5	5	RT	6 : 4
1	1.5	1	RT	7 : 3
1	1.5	1	0	1 : 9
1	1.5	1	30	8 : 2
1	1.1	1	RT	8 : 2
1	2	1	RT	0 : 10

Es hat sich gezeigt, dass bei langer Reaktionszeit ebenso wie mit steigendem Überschuss an PCC eine Zunahme des Benzaldehyd-Anteils im Produktgemisch zu beobachten ist. Auch eine niedrige Reaktionstemperatur begünstigte den Kettenabbau. Als optimal innerhalb der Versuchsreihe erwiesen sich dagegen ein geringer Überschuss an PCC und eine Temperatur von 30 °C, die zu einem 4-fachen Überschuss von **27c** gegenüber dem Benzaldehyd-Derivat führte.

Im Vergleich zu dem mit IBX erreichten Ergebnis war die Verwendung von PCC als eine eindeutige Verbesserung anzusehen, jedoch bestand noch immer Potential für eine weitere Optimierung, denn der Anteil an 4-Chlorphenylacetaldehyd am gesamten Produktgemisch war weiterhin relativ niedrig.

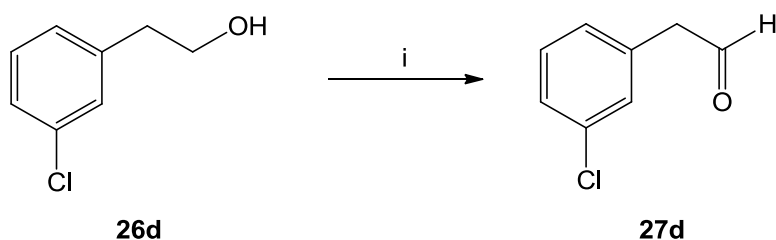
Natriumhypochlorit und 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO)

Quici *et al.* zeigten, dass die Kombination aus Natriumhypochlorit und dem Oxoammoniumsalz TEMPO (**31**) innerhalb kurzer Zeit zu einer selektiven Oxidation von primären Alkoholen zu Aldehyden führte (Schema 4-7).⁷⁴ In einer ersten Testreaktion kam es dann auch zur Bildung des gewünschten Phenylacetaldehyds, während keine Entstehung des kettenverkürzten Benzaldehyds beobachtet wurde. Allerdings verlief die Umsetzung insgesamt unvollständig, sodass weitere Untersuchungen nötig waren.



Schema 4-7: Katalytischer Zyklus des TEMPO (**31**) in Oxidationsreaktionen.⁷⁴

Die Auswirkungen einer Variation der Versuchsbedingungen wurden in einer Versuchsreihe an der Oxidation von 2-(3-Chlorphenyl)ethanol **26d** untersucht. Unter Beobachtung der Änderung des Verhältnisses zwischen Edukt und 3-Chlorphenylacetaldehyd-Anteil im Produktgemisch wurden die Stoffmengenverhältnisse, die Reaktionszeit und die Temperatur variiert.



Schema 4-8: Oxidation von 2-(3-Chlorphenyl)ethanol **26d** mittels Natriumhypochlorit und TEMPO; i: NaOCl, TEMPO, KBr, CH₂Cl₂, Wasser, 0 °C, 2 h.

In Tabelle 2 wird deutlich, dass weder eine Erhöhung der Temperatur noch eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer verbesserten Umsetzung führten. Hingegen stellte sich das Ausmaß des Überschusses an Natriumhypochlorit als entscheidend heraus, denn mit steigendem Anteil verringerte sich die Menge an detektiertem Alkohol im Produktgemisch. Bei einem 5-fachen Überschuss des Oxidationsmittels lag nahezu kein Edukt mehr vor,

allerdings stieg gleichzeitig der Anteil an Nebenprodukten deutlich an, sodass die Ausbeute an 3-Chlorphenylacetaldehyd in dem Gemisch sank. Unter Berücksichtigung weiterer zusätzlich entstandener Nebenprodukte lag die Zielstruktur **27d** bei zweifachem Überschuss des Natriumhypochlorits mit dem größten Anteil im Produktgemisch vor.

Tabelle 2: Veränderung des Edukt/Produkt-Verhältnisses bei Variation verschiedener Reaktionsparameter in der Oxidation von **26d**.

Stoffmenge 26d [mmol]	Stoffmenge NaOCl [mmol]/Äquiv.	Reaktionszeit [h]	Temperatur [°C]	Verhältnis 26d : 27d *
3.72	4.09/1.1	2	0	9.5 : 0.5
3.72	4.09/1.1	2	0 → RT	9.5 : 0.5
3.72	4.09/1.1	5.25	0	9.7 : 0.3
3.72	5.58/1.5	2	0	9.4 : 0.6
3.72	7.44/2.0	2.25	0	3.2 : 6.8
3.72	18.6/5.0	2	0	0.8 : 9.2

* Zur Berechnung der Verhältnisse wurden die Integrale der Signale des Acetaldehydprotons (**26b**, 9.69 ppm) und der 1-Methylen-Gruppe des 3-Chlorphenylethanol (**27d**, 3.61 ppm) im ¹H-NMR-Spektrum verwendet.

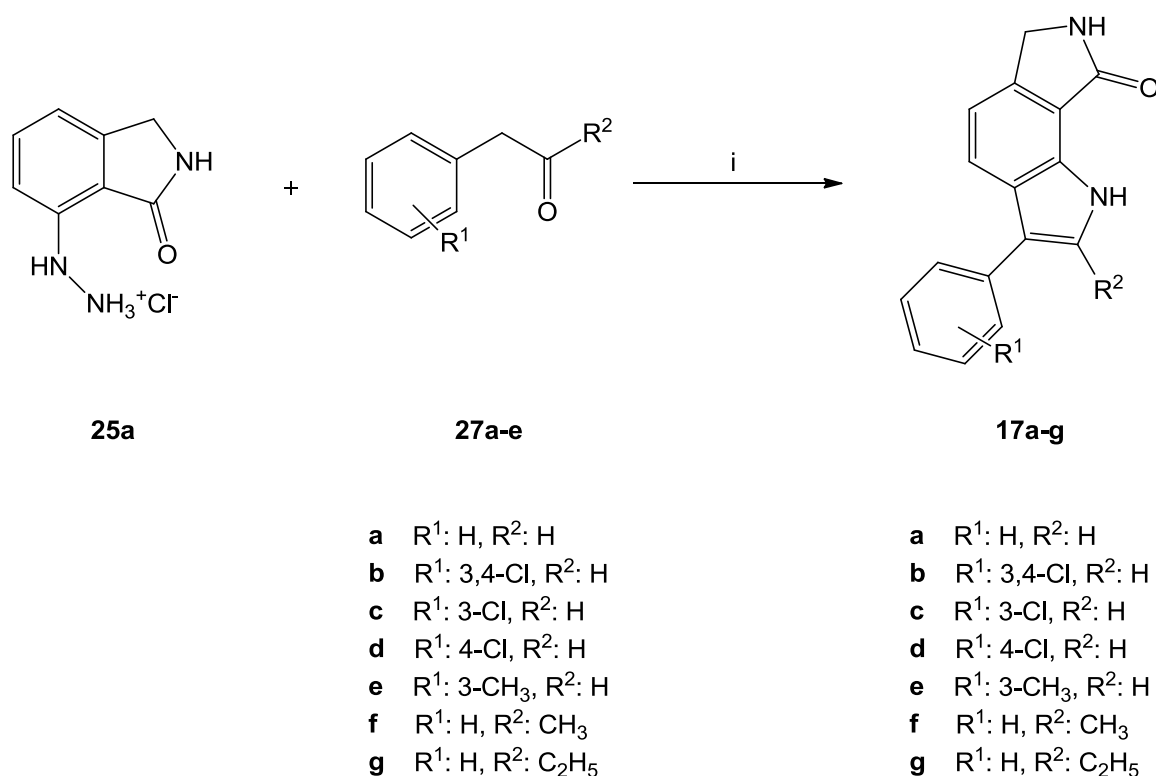
Insgesamt führte die Kombination von Natriumhypochlorit und TEMPO nach der durchgeführten Optimierung der Reaktionsbedingungen im Vergleich zu der Oxidation mit IBX oder PCC zu den besten Resultaten.

4.3 Synthese der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17**

Zur Darstellung von Verbindungen der Klasse **17** wurde die Fischer-Indol-Synthese eingesetzt, wobei verschiedene Methoden für eine optimale Ausbeute untersucht wurden.

Fischer-Indol-Reaktion mit Phenylacetaldehyden

Aus dem beschriebenen Hydrazin **25a** und verschiedenen Phenylacetaldehyden konnte mit einer Zyklisierung nach FISCHER die 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundstruktur **17** aufgebaut werden (Schema 4-9).



Schema 4-9: Indol-Bildung nach FISCHER aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid **25**, sowie den entsprechenden Aldehyden und Ketonen; i: Eisessig, 95 °C, 3.5 h, 10-31%.

Nach der von DETERMANN beschriebenen Methode zur Darstellung des 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundkörpers wurden 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid **25a** und Phenylacetaldehyd **27a** zunächst in einer sechsstündigen Reaktion in Eisessig bei 95 °C zu dem entsprechenden Indol umgesetzt.⁴⁸ Die dünnschichtchromatographische Verfolgung des Reaktionsverlaufs zeigte eine starke Bildung von Neben- bzw. Zersetzungsprodukten bereits zu Beginn, wodurch eine Reinigung des Produkts durch Säulenchromatographie und Umkristallisation erforderlich wurde. Auf Grund dieser Faktoren konnte das Produkt **17a** nur in geringer Ausbeute (21%) isoliert werden und es wurde durch Modifikation der Reaktionsparameter eine Optimierung angestrebt.

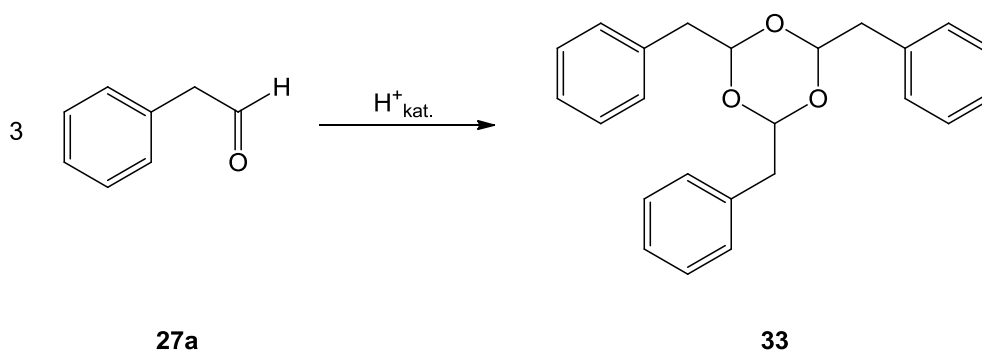
Tabelle 3: Modifikation der Reaktionsparameter zur Optimierung der Indolbildung.

Phenylacetaldehyd-Äquivalente	Lösemittel	Katalysator	Reaktionszeit	Temperatur [°C]	Ausbeute [%]
1	Eisessig	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 4.5 h	6 h	95	31.9
1.5	Eisessig	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 4.5 h	6 h	95	21.0
2	Eisessig	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 4.5 h	6 h	95	13.1
1.5	Eisessig	-	7.5	95	27.8
1	1 h: THF/Wasser ^a 1 h: Diphenyl- ether ^b	-	2 h	1 h: RT ^a 1 h: 250 ^b	-
1	Ethanol	CH ₃ SO ₃ H/P ₄ O ₁₀	1.5 h	RT	-
1	Ethanol	CH ₃ SO ₃ H/P ₄ O ₁₀	2.5	1 h: RT 1.5 h: RT → 40 °C	8.1

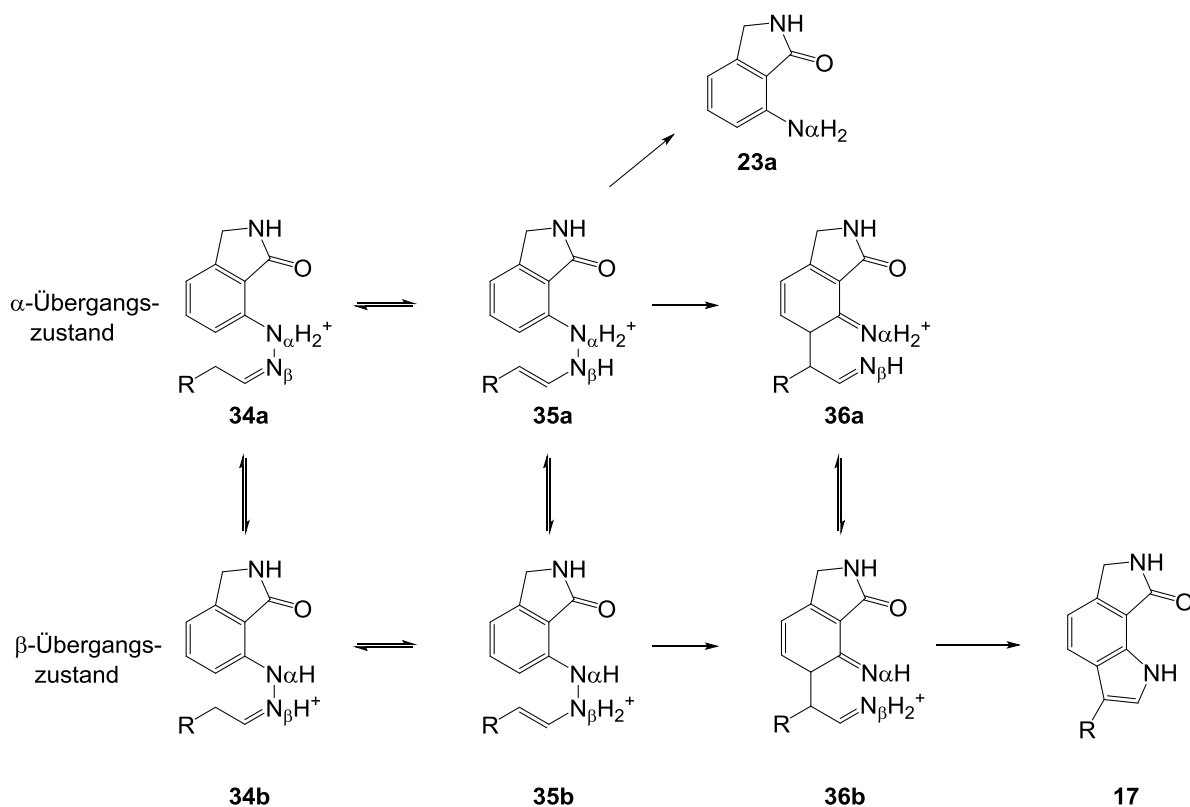
^a Hydrazon-Bildung: nach 1 h Entfernung des Lösemittelgemisches unter Vakuum.

^b Indol-Bildung: thermisch induzierte Zyklisierung des Hydrazons.

An Hand der in Tabelle 3 aufgeführten Ergebnisse wird deutlich, dass sich ein Überschuss an Phenylacetaldehyd negativ auf die Ausbeute auswirkt, wobei der Effekt umso klarer ist, je größer der Überschuss ausfällt. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist das Auftreten von Polymerisationsreaktionen der Aldehyde bei erhöhter Konzentration beispielsweise durch Trimerisierung (Schema 4-10) oder Aldol-Kondensation. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben.⁷⁵⁻⁷⁷

**Schema 4-10:** Trimerisierung von Phenylacetaldehyd bei Anwesenheit von Säuren.

Einen weiteren Grund für die geringen Ausbeuten könnte das Substitutionsmuster am 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin **25** darstellen. ROBINSON *et al.* beschrieben den hemmenden Effekt von elektronenziehenden Substituenten in *ortho*- und *para*-Position des Phenylhydrazins auf die Indol-Bildung.⁷⁸



Schema 4-11: Reaktion der Übergangszustände, die durch Protonierung an unterschiedlichen Stickstoffatomen bei sauer katalysierter Fischer-Indol-Reaktion auftreten.⁷⁹

Die Bedeutung der Stabilität der unterschiedlichen Übergangszustände wurde von ÇELEBI-ÖLÇÜM *et al.* im Zusammenhang mit dem Einfluss verschiedener Carbonyl-Komponenten auf die Fischer-Indol-Reaktion beschrieben. In der Säure-katalysierten Indolsynthese nach FISCHER werden zwei mögliche Übergangszustände (α und β) angenommen, die sich nach der Hydrazon-Entstehung ausbilden. Sie unterscheiden sich in der Protonierung der Stickstoffatome des Hydrazons, was Auswirkungen auf den weiteren Verlauf der Reaktion hat (Schema 4-11). Elektronen-schiebende Substituenten an der Carbonyl-Komponente wirken stabilisierend auf die En-Hydrazin-Bindung des β -Übergangszustands, während der α -Übergangszustand destabilisiert wurde. Für Elektronen-ziehende Substituenten wird die entgegengesetzte Beobachtung gemacht.⁷⁹ Ebenso wie das Substitutionsmuster der Carbonyl-Komponente beeinflussen die Substituenten des Hydrazins die Stabilität der En-

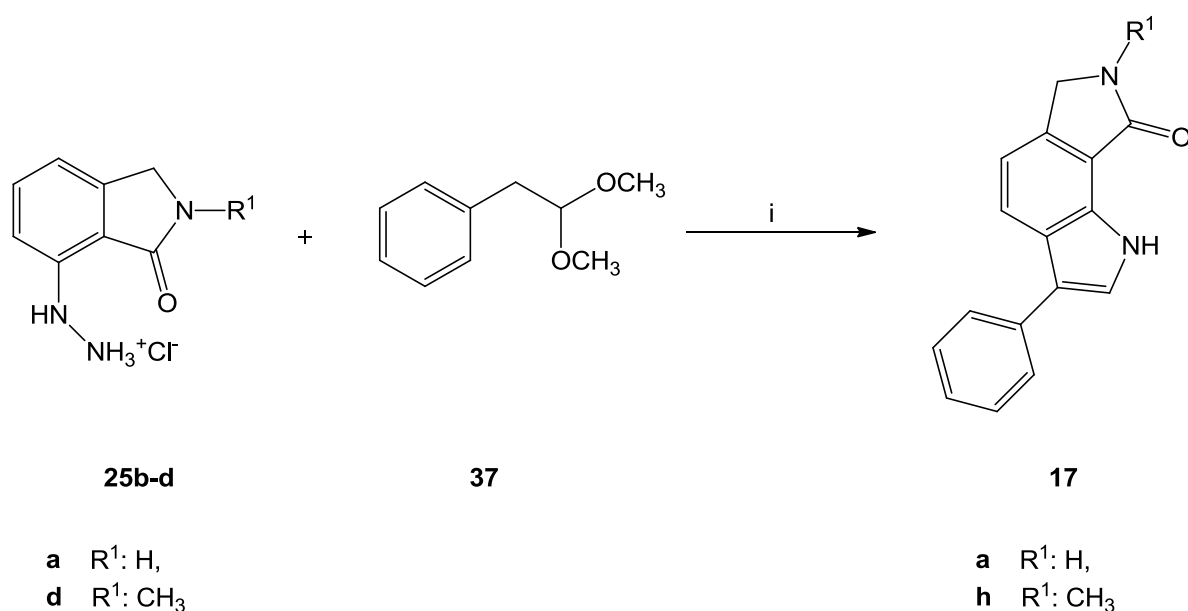
Hydrazin-Bindung. Im Fall des Hydrazins **25** übt die in *ortho*-Position anellierte Lactam-Struktur einen negativen mesomeren Effekt auf den Aromaten aus, wodurch dessen Elektronendichte herabgesetzt wird und der Übergangszustand destabilisiert wird, in dem das α -Stickstoffatom protoniert vorliegt (Schema 4-11, α -Übergangszustand). Ausgehend von diesem Übergangszustand ist sowohl eine sigmatrope Umlagerung zu **36a** als auch die heterolytische Spaltung unter Freisetzung des Anilin-Derivats **23a** und eines Iminylcarbokations möglich. Dementsprechend wirkt sich dieser Reaktionsweg durch Bildung von Nebenprodukten negativ auf die Ausbeute aus.

Die als saurer Katalysator nach der initialen Hydrazon-Bildung zum Reaktionsgemisch hinzugefügte Schwefelsäure hatte kaum positive Auswirkungen auf das Ergebnis. Die Verwendung des Methansulfonsäure/Phosphorpentoxid-Reagenzes anstatt der Schwefelsäure führte zu einer starken Verschlechterung der Ausbeute und bei Raumtemperatur wurde keine Produktbildung beobachtet. Im Gegensatz zur sauren Katalyse in Eisessig sollte das Indol in Diphenylether nach der Hydrazon-Bildung durch thermische Energie erzeugt werden, aber auch dieser Ansatz lieferte kein Produkt.

Die Optimierungsversuche zeigten, dass die Reaktion in Eisessig bei einem geringen Überschuss an Phenylacetaldehyd die besten Ergebnisse lieferte, die Ausbeute aber weiterhin niedrig blieb, sodass andere Verfahren untersucht wurden. Nichtsdestotrotz konnten nach dieser Methode die Zielstrukturen **17a-g** dargestellt werden, wobei mit den Ketonen **27f** und **27g** analog zu den Aldehyden verfahren wurde.

Fischer-Indol-Reaktion mit Phenylacetaldehyddimethylacetal

Auf Grund der beschriebenen Problematik der Selbstkondensation der Phenylacetaldehyde wurde die Verwendung des Dimethylacetals als stabileres Aldehyd-Substitut getestet (Schema 4-12).



Schema 4-12: Fischer-Indol-Reaktion unter Verwendung von Phenylacetaldehyddimethylacetal; i: Eisessig, 3.5 h, 95 °C, 15.0-31.0%.

Um die Ergebnisse mit den vorherigen Versuchen vergleichen zu können, wurden verschiedene Bedingungen der Methode ebenfalls für **25a** und Phenylacetaldehyddimethylacetal **37** untersucht, wobei berücksichtigt wurde, dass sich äquimolare Verhältnisse an Arylhydrazin und Aldehyd als vorteilhaft erwiesen hatten (Tabelle 4). Veränderungen der Reaktionstemperatur sowie der Reaktionszeit machten deutlich, dass hohe Ausbeuten nur bei einer Temperatur von 95 °C erreicht wurden und dass längere Reaktionszeiten sich nicht positiv auf die Produktbildung auswirkten. Weiterhin hatte die Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure als Katalysator praktisch keinen Effekt auf die erhaltene Ausbeute. In einer mikrowellen-katalysierten Reaktion konnte das Produkt **17a** ebenfalls erhalten werden. Vorteilhaft war hierbei die sehr kurze Reaktionszeit (10 min), jedoch wurde nur eine vergleichsweise geringe Produktmenge (19.2%) isoliert.

Tabelle 4: Variation der Reaktionsparameter der Fischer-Indol-Reaktion in Eisessig unter Verwendung von Phenylacetaldehyd-Dimethylacetal.

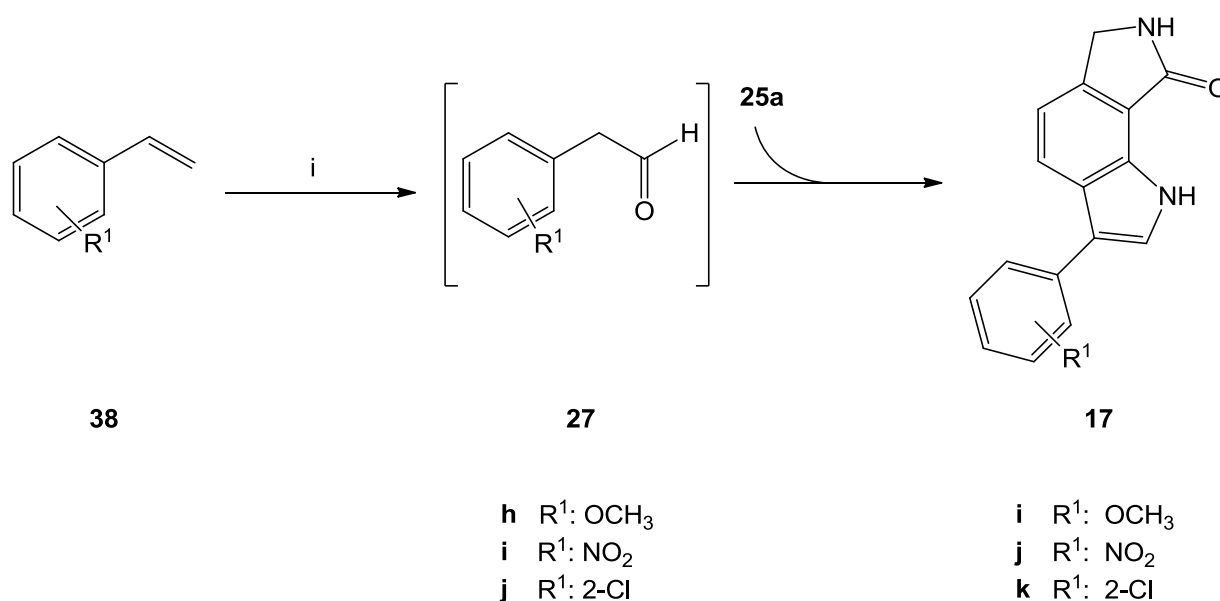
Äquivalente von 37	Katalysator	Reaktionszeit	Temperatur [°C]	Ausbeute [%]
1	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 7 h	8.5 h	95	27.8
1	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 2.5 h	3.5 h	95	31.3
1	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 2.5 h	3.5 h	50	17.7
1	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 15 h	16 h	50	24.2
1	-	3.5 h	95	30.9
1	Mikrowelle ^a	10 min	160	19.2

^a Rampenzeit = 5 min, Reaktionszeit = 5 min, $p_{\text{max}} = 250 \text{ psi}$, $P_{\text{max}} = 200 \text{ W}$.

Obwohl die Verwendung des Acetals die Handhabung durch erhöhte Eduktstabilität und geringere Viskosität verbesserte, konnte die Produkt-Ausbeute gegenüber dem Einsatz des Aldehyds nicht gesteigert werden. Durch Fischer-Indol-Synthese mit Phenylacetaldehyddimethylacetal als Aldehyd-Substitut wurden die 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17h**, **21a-b** und **50a** dargestellt.

Fischer-Indol-Reaktion mit *in situ* Aldehyd-Synthese

Ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Indol-Ausbeute war die Verwendung von Styrenen als Aldehyd-Vorstufen, die *in situ* zu den Aldehyden oxidiert und darauffolgend direkt mit Arylhydrazinen umgesetzt wurden.⁸⁰ Von GRUBBS *et al.* wurde dabei die Bildung eines Hydrazons aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin und verschiedenen *in situ* generierten Aldehyden beschrieben. Bei der Oxidation des Styrens handelte es sich um eine selektive Wacker-Oxidation am endständigen Kohlenstoffatom, wobei der Anteil an dem jeweils entsprechenden Keton-Derivat < 5% lag. Für die Übertragung der Reaktion auf die Synthese der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one wurde die Darstellung der Verbindung **17i** gewählt (Schema 4-13). Trotz der relativ niedrigen Temperatur von 50 °C nach Zugabe des Arylhydrazins **25a** kam es nach erfolgter Hydrazon-Bildung zur sofortigen Zyklisierung, sodass ausschließlich das Indol aus dem Produktgemisch isoliert wurde.

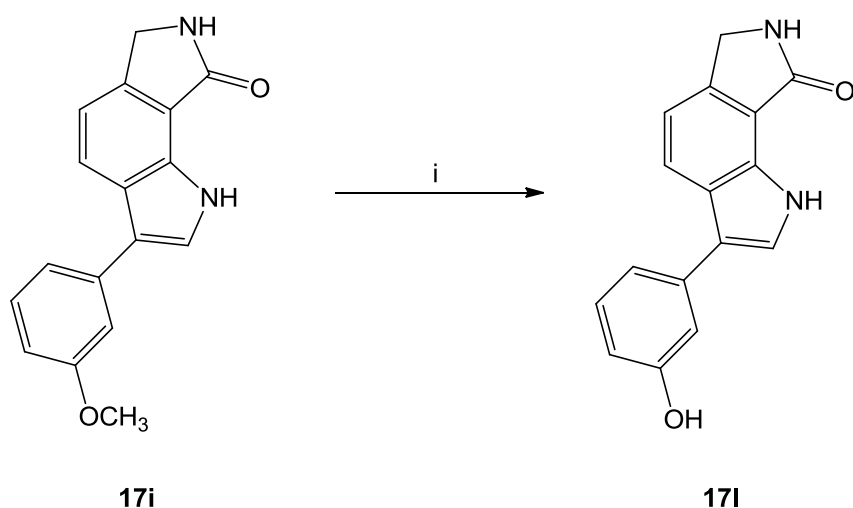


Schema 4-13: *In situ* Darstellung von Phenylacetaldehyden aus Styrenen **38** nach GRUBBS et al. mit anschließender Fischer-Indol-Reaktion;⁸⁰ i: *tert*-Butanol, *p*-Benzochinon, PdCl₂(MeCN)₂, 7.8-27.7%.

Allerdings fiel die Ausbeute mit 27.7% auch bei diesem Verfahren wie bereits bei den bisher beschriebenen Methoden eher gering aus. Ein Vergleich mit dem Ergebnis der klassischen Fischer-Indol-Synthese aus kommerziell erworbenem 3-Methoxyphenylacetaldehyd (1.5 Äquiv.) und dem Arylhydrazin-Hydrochlorid **25a** in Eisessig zeigt jedoch, dass es sich dennoch um eine Verbesserung handelte. Die Zielstruktur **17i** wurde auf letzterem Weg nur in einer Ausbeute von 11.5% erhalten. Dadurch, dass eine größere Anzahl an Styren-Derivaten kommerziell verfügbar war und deren Stabilität gegenüber den Phenylacetaldehyden größer ist, wurde die *in situ* Wacker Oxidation zur Methode der Wahl und es konnten die Verbindungen **17i-k** auf diese Weise hergestellt werden.

Demethylierung von 3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **17i**

Im Anschluss an die Indol-Synthese bot sich die weitere Derivatisierung bestimmter Vertreter der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one an. So eröffnet die Demethylierung der Methoxy-Funktion in Verbindung **17i** die Möglichkeit zur vielfältigen Variation durch Einführung von Substituenten an der entstehenden Hydroxy-Gruppe. Das 3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17i**) wurde unter Stickstoffbe-gasung bei Raumtemperatur mit Bortribromid zum Phenol **17l** umgesetzt (Schema 4-14).⁸¹

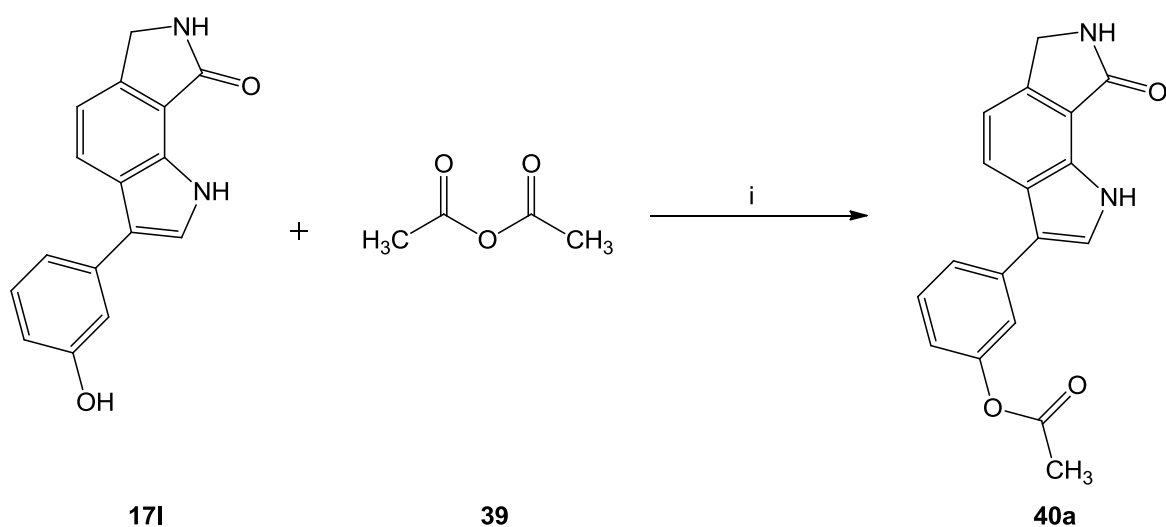


Schema 4-14: Demethylierung des Methoxyphenyl-Restes in Verbindung **17l** mittels Bortribromid-Lösung; i: BBr₃, CH₂Cl₂, N₂, RT, 1 h, 33.4%.

Nach erfolgter Reaktion wurde der Überschuss an Bortribromid durch Zusatz von Wasser unter Bildung von Borsäure und Bromwasserstoffsäure inaktiviert. Die gleiche Methode wurde ebenso für die Demethylierung von *N*-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid **19h** zu **19i** verwendet.

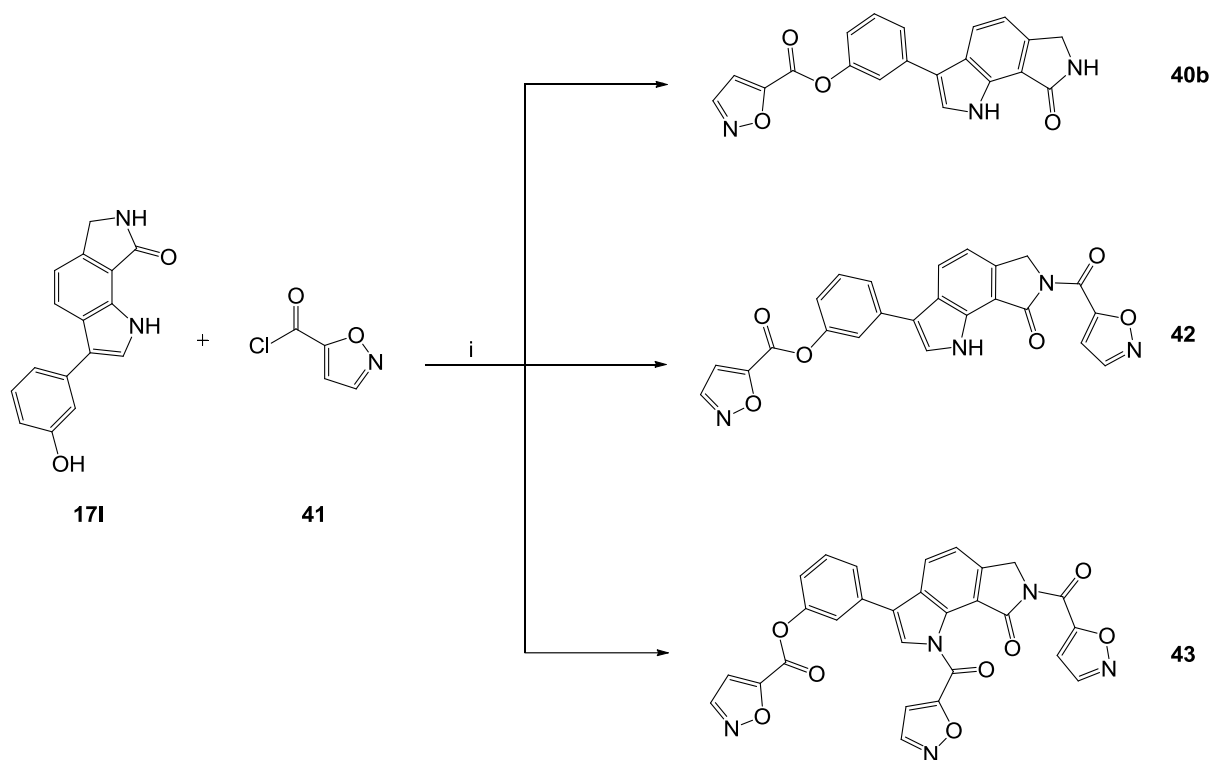
Acetylierung des Phenols **17l**

Durch Bildung verschiedenartiger Ester sollten zusätzliche Interaktionen mit der ATP-Bindetasche der CLK1 erschlossen werden. Zunächst wurde das Phenol **17l** in Pyridin durch Acetanhydrid acetyliert, wobei 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) als Katalysator hinzugesetzt wurde (Schema 4-15).⁸²



Schema 4-15: Acetylierung von Verbindung **17l** mit Acetanhydrid in Pyridin unter Verwendung von 4-DMAP als Katalysator; i: 4-DMAP, getr. Pyridin, RT, 2 h, 29.2%.

In weiteren Versuchen wurde die Acylierung von Verbindung **17l** mit Isoxazol-5-carbonsäurechlorid unter ähnlichen Bedingungen getestet. Unter Stickstoffbegasung wurde das Phenol zunächst in getrocknetem Pyridin unter Zusatz von 4-DMAP und Diisopropylethylamin (DIPEA) deprotoniert. Erst im Anschluss erfolgte die Zugabe des Säurechlorids in zweifachem Überschuss.^{82, 83}

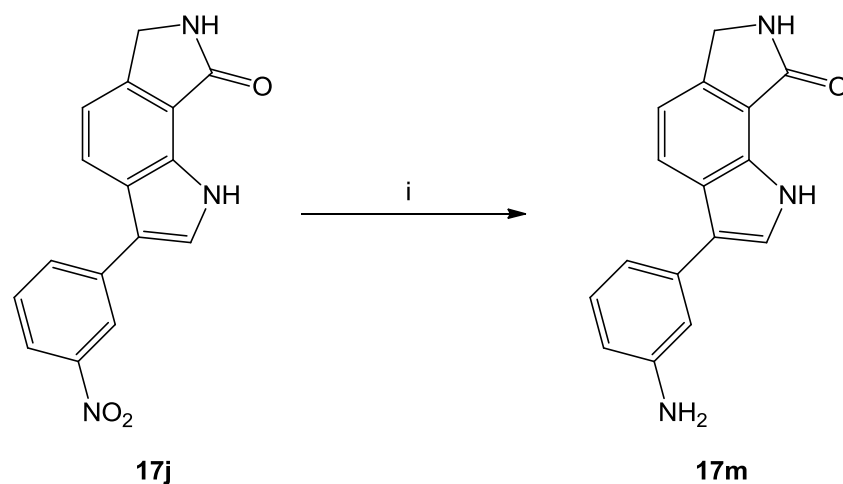


Schema 4-16: Acylierung des Phenols **17l** durch Isoxazolyl-5-carbonylchlorid in getrocknetem Pyridin; *i*: getr. Pyridin, 4-DMAP, DIPEA, 1 h, RT.

Es wurde ein Produktgemisch erhalten, aus dem jedoch die Zielstruktur **40b** nicht in einer für biologische Untersuchungen ausreichenden Reinheit isoliert werden konnte (Schema 4-16). Stattdessen wurde das dreifach acylierte Derivat **43** gewonnen, welches Isoxazolylcarbonyl-Reste sowohl an dem phenolischen Sauerstoff als auch an dem Stickstoff des Indols und des Lactams aufwies. Obwohl lediglich ein zweifacher Überschuss eingesetzt wurde, reagierte das Phenol demnach mit drei Äquivalenten des Säurechlorids, sodass gleichzeitig auch das unsubstituierte Edukt im Gemisch zurückblieb. Der Austausch des Lösemittels gegen Dimethylformamid oder Dichlormethan brachte keine Vorteile mit sich, denn auch in diesen Fällen setzte sich das Rohprodukt aus einer Mischung unterschiedlicher Acylierungsgrade des 3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-ons zusammen.

Reduktion von 3-(3-Nitrophenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on 17j

Durch die Reduktion der Nitro-Gruppe in 3-Position des Phenyl-Restes wurde der Austausch eines Wasserstoffbrücken-Akzeptors gegen einen Donator vorgenommen. Als Reduktionsmittel wurde analog zu der Reduktion des Diazonium-Salzes **24** ein System aus konzentrierter Salzsäure und Zinn(II)chlorid verwendet (Schema 4-17).^{84, 85}

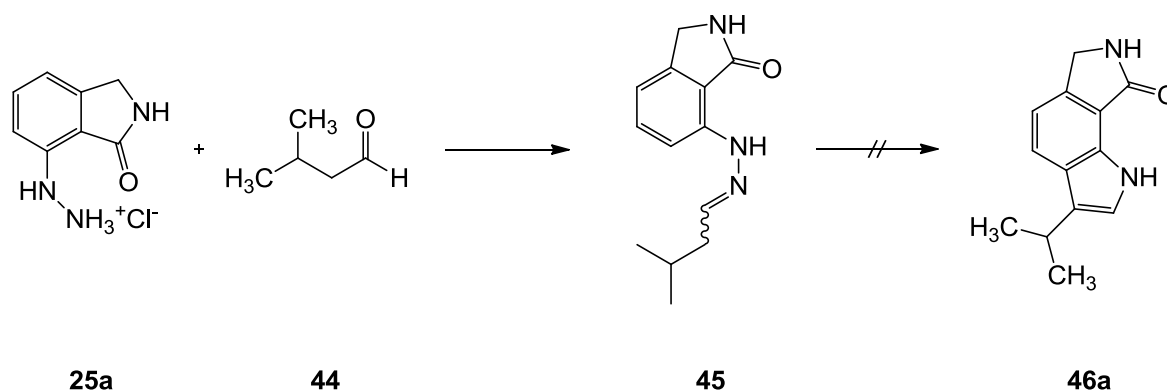


Schema 4-17: Reduktion der 3-Nitro-Gruppe zum aromatischen Amin (**17m**) mit Zinn(II)chlorid als Reduktionsmittel; i: HCl (37%), SnCl₂ x 2 H₂O, RT → 80 °C, 1 h, 27.9%.

Das gewünschte Anilin-Derivat konnte auf diesem Weg dargestellt, allerdings nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden.

4.4 Versuche zur Synthese von 3-Alkyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-onen

Um die Bedeutung des Phenyl-Substituenten in 3 Position des Dihydropyrroloindolons bewerten zu können, wurde der Versuch unternommen, diesen durch aliphatische Reste zu ersetzen. Hierfür wurde das 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid **25a** mit 3-Methylbutanal **44** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umgesetzt, doch konnte das gewünschte Produkt **46a** dabei nicht isoliert werden (Schema 4-18).



Schema 4-18: Versuch der Indol-Bildung aus **25a** und 3-Methylbutanal.

Unter den in Tabelle 5 beschriebenen Bedingungen wurde in den meisten Fällen dünn-schichtchromatographisch nur die Bildung von Zersetzungsprodukten beobachtet. Darüber hinaus konnte zum Teil das Auftreten des Hydrazons **45** festgestellt werden, welches bei der Umsetzung von Phenylacetaldehyden lediglich als nicht isolierbares Intermediat während der Indol-Bildung auftrat. Versuche, das isolierte 7-[2-(3-Methylbutyliden)hydrazinyl]-isoindolin-1-on **45** nachfolgend zum Indol zu cyclisieren, waren nicht erfolgreich.

Tabelle 5: Variation der Reaktionsparameter mit dem Ziel der Darstellung von 3-Isopropyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **46a**.

Äquivalente von 44	Lösemittel	Katalysator	Reaktions- zeit	Temperatur	Ausbeute [%]
1.5	Eisessig	0.1 mL H ₂ SO ₄ nach 4.5 h	6.5 h	95 °C	-
1	Eisessig	-	4.25 h	95 °C	-
1.5	Eisessig	-	4 h	RT	10.1% (Hydrazon)
1	1. THF/Wasser	0.1 mL H ₂ SO ₄	1. 2 h	1. RT	-
	2. Eisessig	nach 2 h	2. 1 h	2. 95 °C	
1	Ethanol	Polyphosphor- säure (12 g)	1 h	RT→120 °C	-
1	Ethanol	Methansulfon- säure (5 g)	16 h	50 °C	-
1	1. THF/Wasser	-	1. 45 min	1. RT	-
	2. Diphenylether		2. 6 h	2. RT→250 °C ^a	
1	Eisessig	Mikrowelle ^b	25 min	160 °C	-
1	Eisessig	Mikrowelle ^c	65 min	160 °C	-

^a Durchführung unter Stickstoffbegasung.^b Rampenzeit = 5 min, Reaktionszeit = 20 min, p_{\max} = 250 psi, P_{\max} = 200 W.^c Rampenzeit = 5 min, Reaktionszeit = 60 min, p_{\max} = 250 psi, P_{\max} = 200 W.

Nach einer Vorschrift von CAMPOS *et al.* wurde in diesem Zusammenhang auch die Säure-katalysierte Synthese des 3-(2-Hydroxyethyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons **46b** aus Dihydrofuran in Dimethylacetamid getestet.⁸⁶ Wiederum konnte jedoch nur das Hydrazon als Vorstufe isoliert werden. Interessanterweise wurde dabei das Auftreten der E/Z-Isomere sichtbar (Abbildung 27).

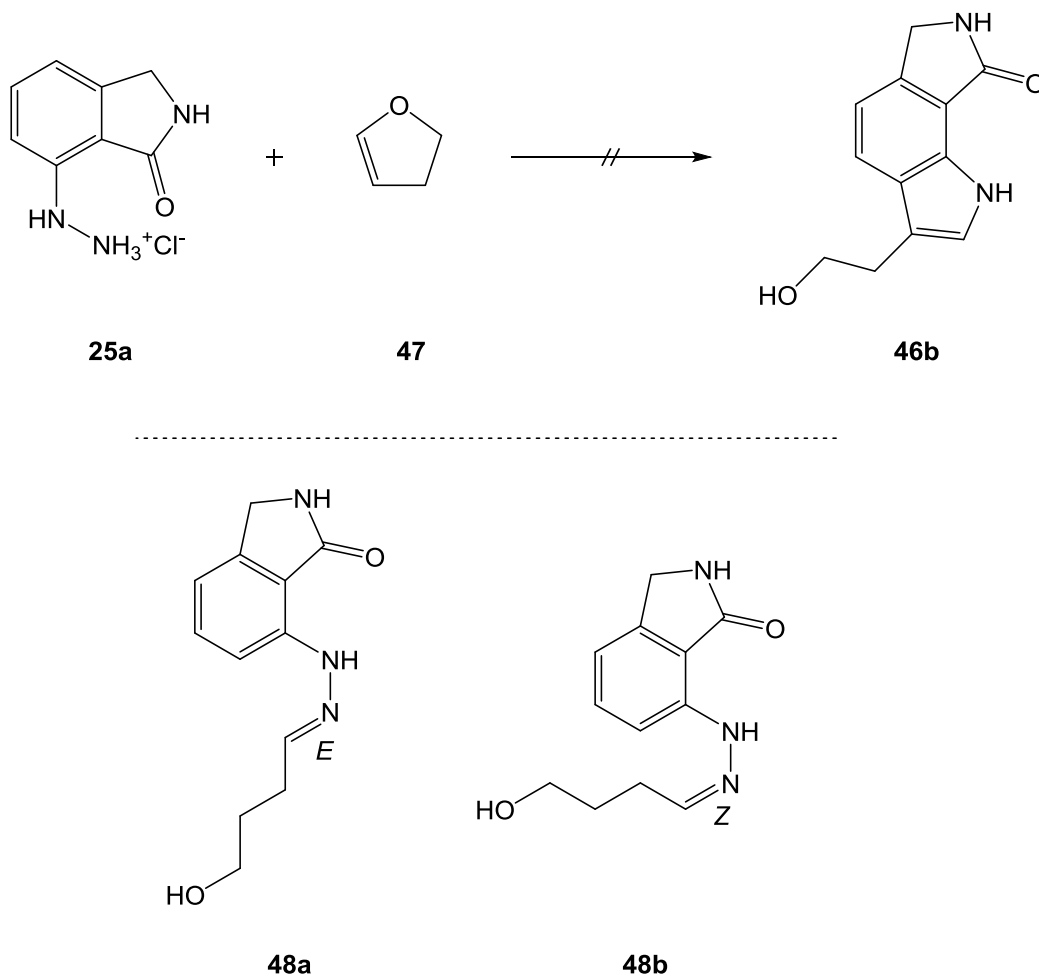


Abbildung 27: Geplanter Syntheseweg des 3-(2-Hydroxyethyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **46b** als Zielstruktur und die stattdessen isolierten Vorstufen **48a** und **48b**.

In der ^1H -NMR-spektroskopischen Analyse wurde ein doppelter Signalsatz beobachtet, welcher die Anwesenheit beider Isomere bestätigte und zeigte, dass diese im Verhältnis 1 : 1 im Produktgemisch enthalten waren (Abbildung 28).

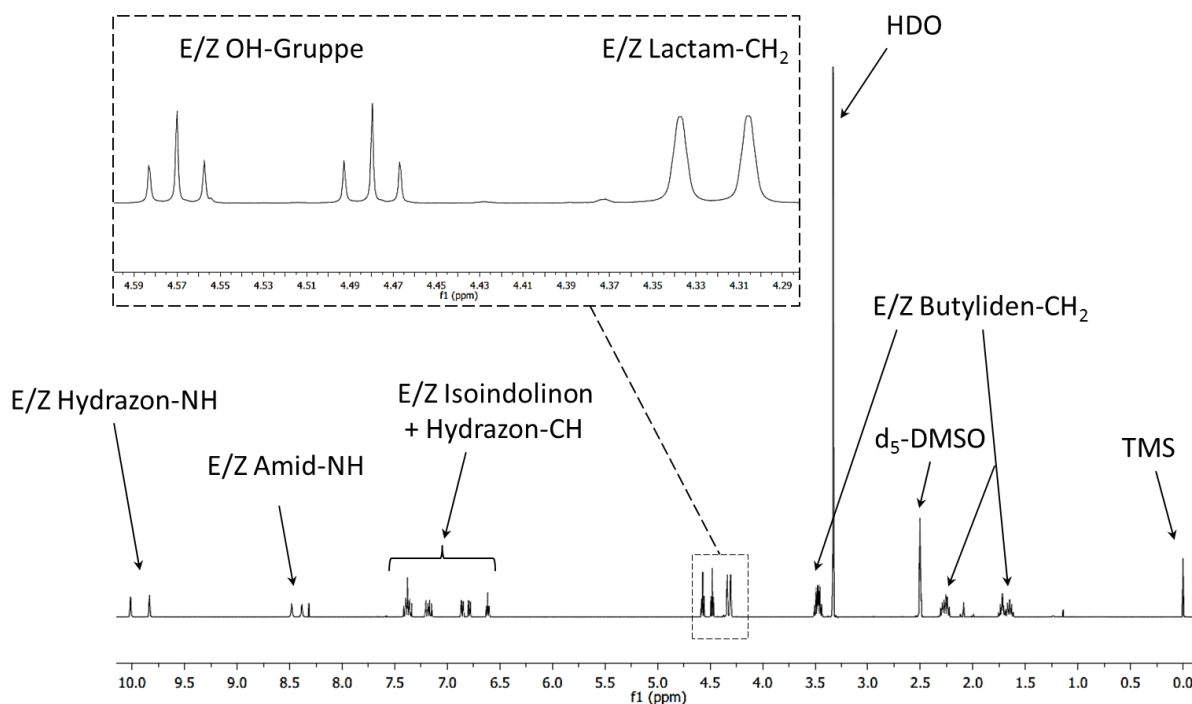


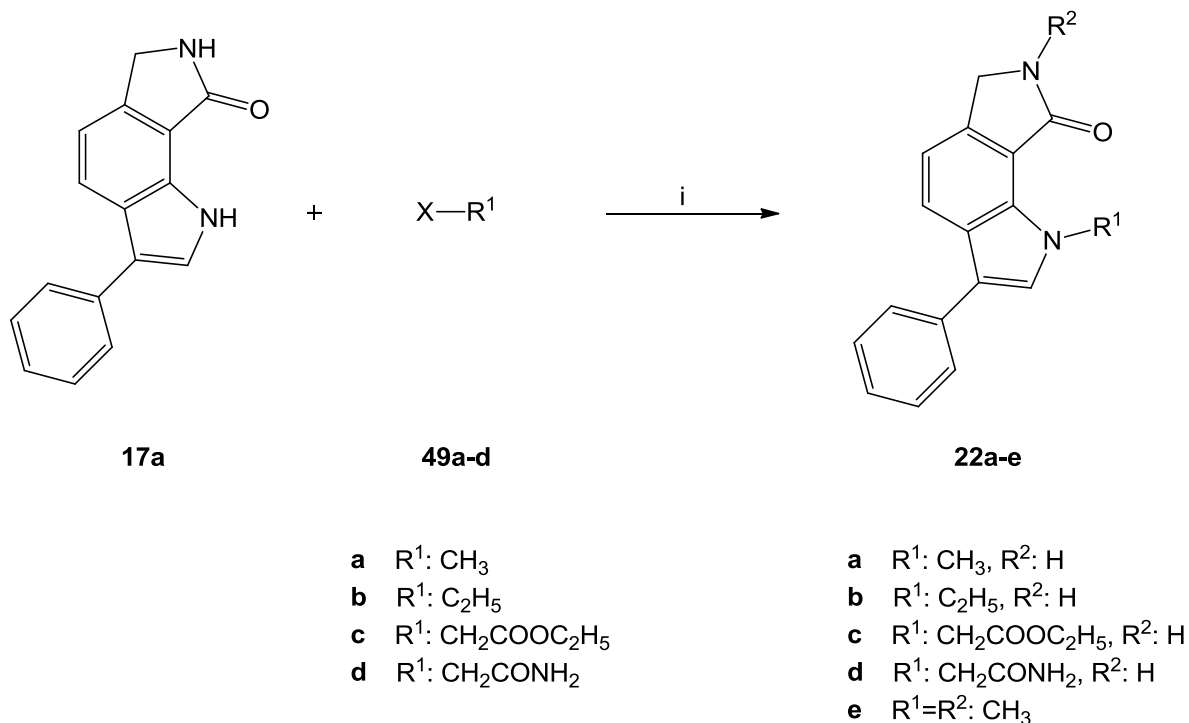
Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Gemisches der E/Z-Isomere von Verbindung **48** in d_6 -DMSO.

Bei einer Verschiebung von ca. 10 ppm weist das Spektrum zwei Singulets auf, die jeweils den Protonen an den Stickstoffatomen der Hydrazon-Gruppen entsprechen. Ebenso genau lassen sich die Singulets bei ca. 8.4 ppm den NH-Protonen der Lactam-Strukturen zuordnen. Im Bereich der aromatischen Protonen zwischen 6.5 ppm und 7.5 ppm ist eine genaue Zuordnung auf Grund der Überlagerung der Multipletts schwierig. Eindeutig wird das Vorliegen zweier Signalsätze aber wieder im Fall der Triplet-Signale der Hydroxyl-Funktionen, welche bei 4.5 ppm und bei 4.6 ppm auftreten. Des Weiteren lassen sich bei einer Verschiebung von ca. 4.3 ppm zwei Singulets für die Methylen-Gruppen der Pyrrolidinon-Strukturelemente finden. Dagegen sind die Signale für die Methylen-Gruppen der Butyriden-Partialstrukturen in drei Multipletts im hohen Feld gruppiert, die eine einzelne Zuordnung nicht zu lassen.

4.5 Synthese *N*-substituierter 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **22**

Die Alkylierung des *N*1-Indolstickstoffs in der Verbindung **17a** bot die Möglichkeit, die mittels molekularem *docking* erstellte Hypothese über den Bindemodus der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one in CLK1 zu unterstützen. Da es an dieser Position nicht zu einer direkten Interaktion mit der *hinge*-Region der Kinase kam, sollte die Einführung von kleineren Substituenten, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, ohne Aktivitätsverlust möglich sein.

Es bestand im Gegenteil die Annahme, dass durch die Wahl eines Substituenten mit passender Wasserstoffbrückenbindungskapazität eine zusätzliche Interaktion mit der *hinge*-Region möglich wäre.



Schema 4-19: Alkylierung der Stickstoffatome des 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons **17a** durch Halogenalkane; i: Aceton, KOtBu, 24 h, RT, 15.3-47.8%.

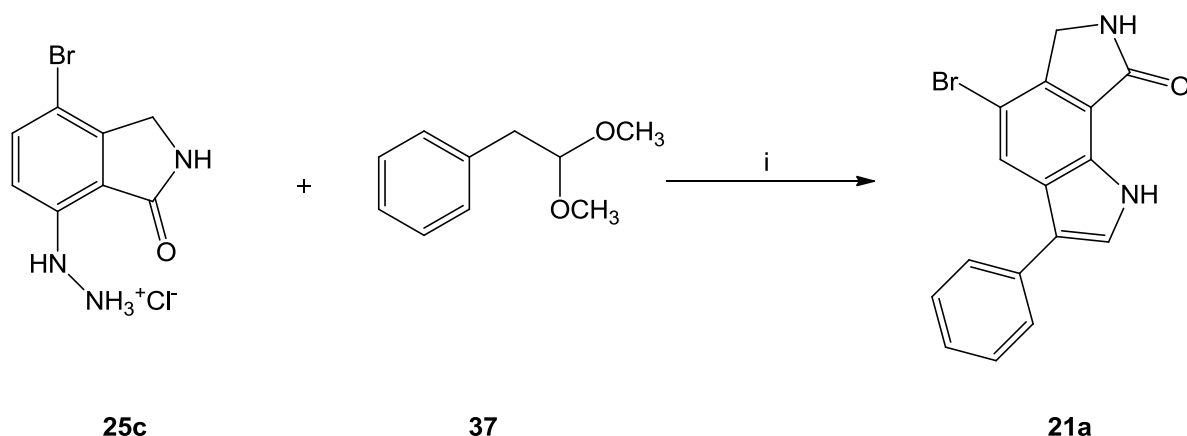
Verschiedene Alkyl-Reste konnten durch nukleophile Substitution auf den Indol-Stickstoff übertragen werden (Schema 4-19). Für die selektive Alkylierung der *N*1-Position war die Wahl des Lösemittels von besonderer Bedeutung. Wie zuvor von SCHULZ *et al.* beschrieben, begünstigte die Verwendung von Aceton die Substitution an dem Indol-Stickstoff in Paullonen, während das Stickstoffatom einer außerdem vorhandenen Lactam-Gruppe unsubstituiert blieb. Der Austausch der eingesetzten Base hatte dagegen keinen beobachtbaren Effekt auf diese Selektivität.⁶⁷ Bei der Alkylierung der Verbindung **17a** waren diese Beobachtungen ebenfalls zutreffend, sodass die *N*1-Alkyl-Verbindungen **22a-22d** synthetisiert werden konnten.

Der Versuch, eine selektive Methylierung des Lactamstickstoffs in getrocknetem THF analog zu der von SCHULZ beschriebenen Methode durchzuführen, resultierte in einem Produktgemisch aus der *N*1-Methyl (**22a**)- und der *N*1,*N*7-Dimethyl-Verbindung **22e**. Das Gemisch

konnte mittels präparativer HPLC getrennt werden, sodass auf diesem Weg auch die zweifach methylierte Verbindung in ausreichender Reinheit gewonnen werden konnte.

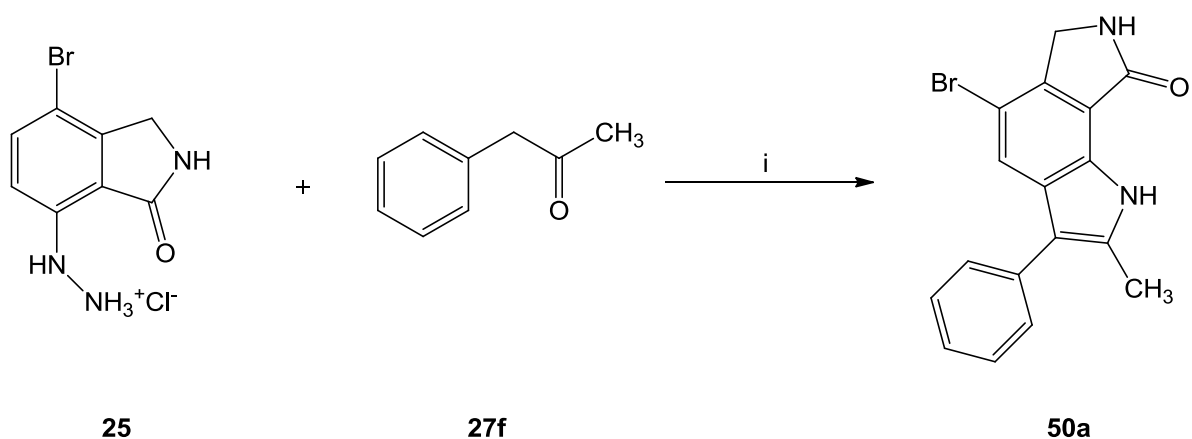
4.6 Synthese 5-substituierter 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **21a-e**

Die in 5-Position halogenierten 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **21a-b** waren zugänglich durch eine Fischer-Indol-Reaktion aus den halogenierten Hydrazinen **25c-d** und Phenylacetaldehyddimethylacetal **37**, analog zu der in Kapitel 4.3 beschriebenen Vorgehensweise (Schema 4-20).



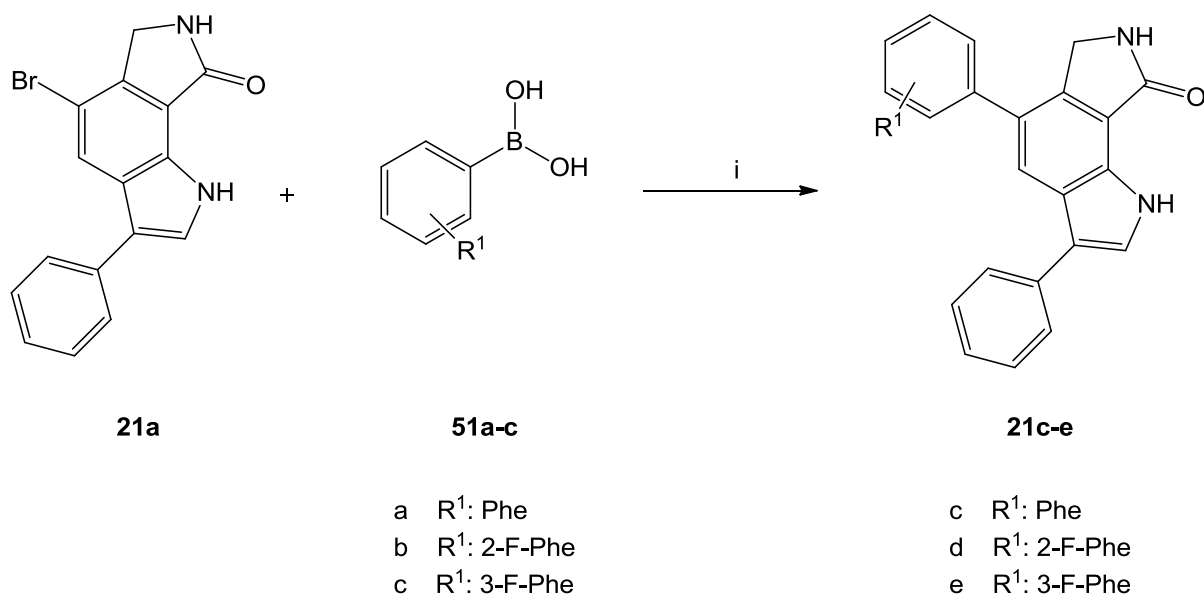
Schema 4-20: Darstellung 5-halogenerter 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one am Beispiel der Brom-Verbindung **21a**; i: Eisessig, 95 °C, 3.5 h, 28.0%.

In den *docking*-Studien zeigte sich, dass der Platz in der ATP-Bindetasche der CLK1 für Substituenten in 5-Position begrenzt ist (Kapitel 3.1, Abbildung 15). Um die Beschränkung in der Größe des Substituenten näher zu charakterisieren, wurde in einer Suzuki-Kupplung Verbindung **21a** mit verschiedenen Phenylboronsäuren unter Palladium-Katalyse zu den 5-Phenyl-Derivaten **21c-e** umgesetzt (Schema 4-22).⁸⁷ Die Synthese wurde in einem abgeschlossenen System durchgeführt, wobei der Energieeintrag durch Mikrowellenstrahlung erfolgte.⁸⁸ Als Katalysator wurde ein Komplex aus Palladium(0) und vier Triphenylphosphin-Liganden verwendet, der als stabil bei hohen Temperaturen beschrieben wird. Nachteilig ist jedoch die geringere katalytische Aktivität im Vergleich zu Palladium-Katalysatoren ohne Triphenylphosphin-Liganden, wie beispielsweise Palladiumacetat, sodass es zu vergleichsweise geringeren Ausbeuten kommen kann.



Schema 4-21: Darstellung von 5-Brom-2-methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **51**; *i*: Eisessig, 95 °C, 3.5 h, 19.0%.

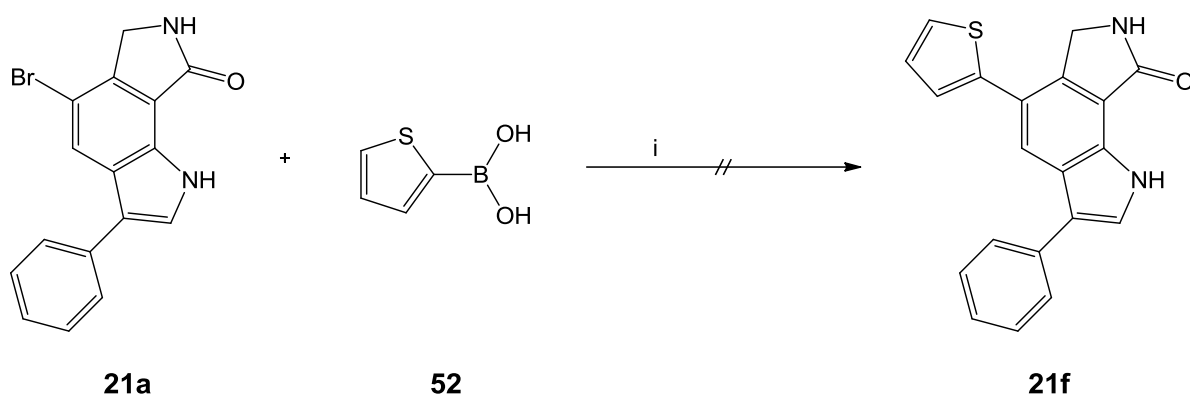
Nach der gleichen Methode konnte auch das 5-Brom-2-methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on **50a** unter Verwendung von 1-Phenylpropan-2-on erhalten werden (Schema 4-21).



Schema 4-22: Suzuki-Miyaura-Kupplung von Verbindung **21a** mit unterschiedlich substituierten Phenylboronsäuren **51a-c**; *i*: Pd(PPh₃)₄, MW: *ramp time*: 5 min, Reaktionszeit 20 min, T_{max} 150 °C, ρ_{max} 250 psi, EtOH/Toluol, 5.4-31.2%.

Der Versuch, Thiophenboronsäuren auf dem beschriebenen Weg mit der bromierten Ausgangsverbindung **21a** zu kuppeln, führte nicht zu einem isolierbaren Produkt (Schema 4-23). Bei der Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) in Kombination mit

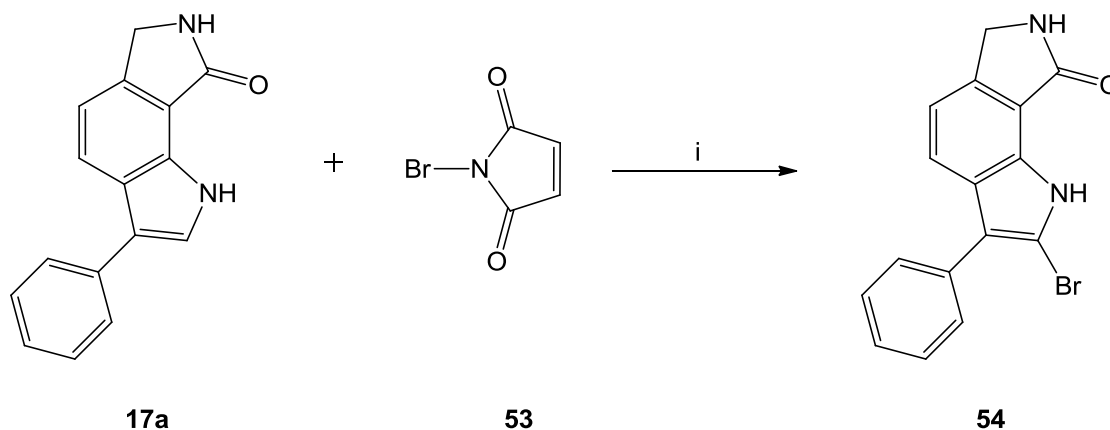
Bisacetonitrilpalladium(II)chlorid zeigte die NMR-spektroskopische Analyse die Bildung eines nicht identifizierten Nebenprodukts.



Schema 4-23: Versuch der Suzuki-Miyaura-Kupplung zwischen **21a** und Thiophen-2-boronsäure **52**; i: Toluol/Ethanol, MW, 150 °C, 20 min.

4.7 Synthese von 2-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on **54**

Um eine Bromierung in 2-Position der Grundstruktur zu erreichen, wurde zunächst die unsubstituierte Verbindung **17a** synthetisiert. In einer Reaktion mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) in einem Gemisch aus Dichlormethan und Eisessig wurde das Brom selektiv auf Position 2 der Grundstruktur übertragen (Schema 4-24).⁸⁹



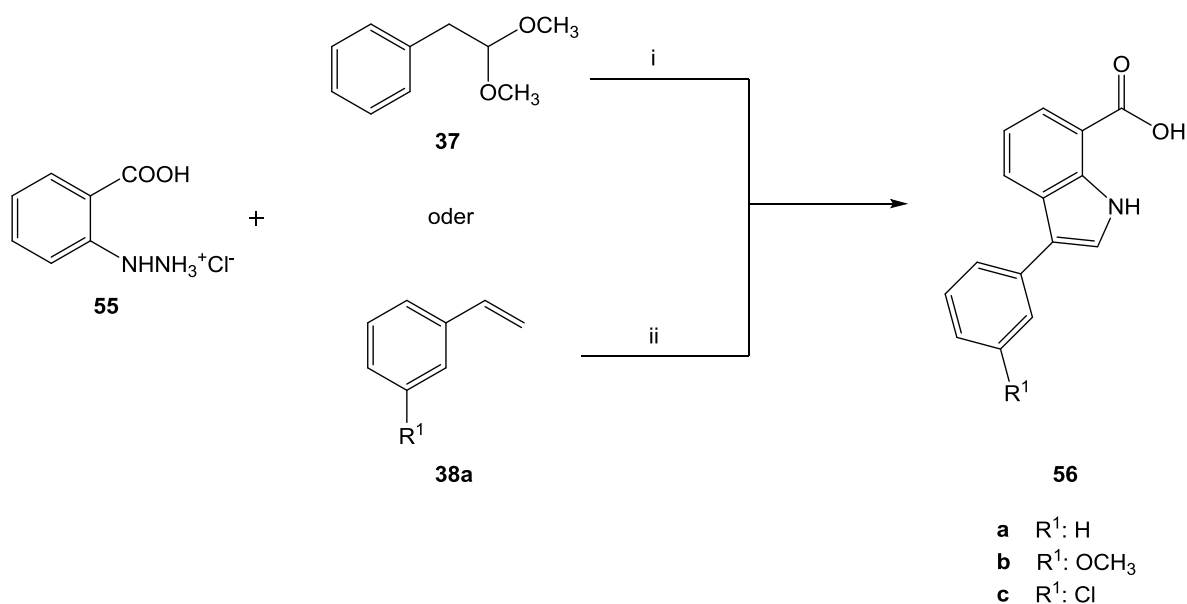
Schema 4-24: Selektive Bromierung der 2-Position mit *N*-Bromsuccinimid; i: CH₂Cl₂, Eisessig, 1.4 h, 28.7%.

Die Entstehung des auf anderem Weg dargestellten 5-Brom-Derivats **21a** wurde hierbei nicht beobachtet. Analog konnte durch Austausch des NBS gegen *N*-Iodsuccinimid auch die 2-Iod-Verbindung isoliert werden, die auf Grund mangelnder Reinheit aber nicht biologisch evaluiert werden konnte.

4.8 Synthese von 3-Aryl-1*H*-indol-7-carboxamiden **19**

Bei den *docking*-Studien der Verbindungsklasse **17** stellte sich das Lactam-Strukturelement als wichtiger Bindungspartner für Wasserstoffbrückenbindungen zur *hinge*-Region in der ATP-Bindetasche heraus. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob diese Wasserstoffbrücken unter Erhalt der Aktivität der Verbindungen auch durch andere Interaktionen ersetzt werden könnten. Die ringoffenen Amide **19** unterscheiden sich von den Lactamen insbesondere durch ihre erhöhte Flexibilität, da die Amid-Struktur nicht Teil des zentralen Ringsystems ist.

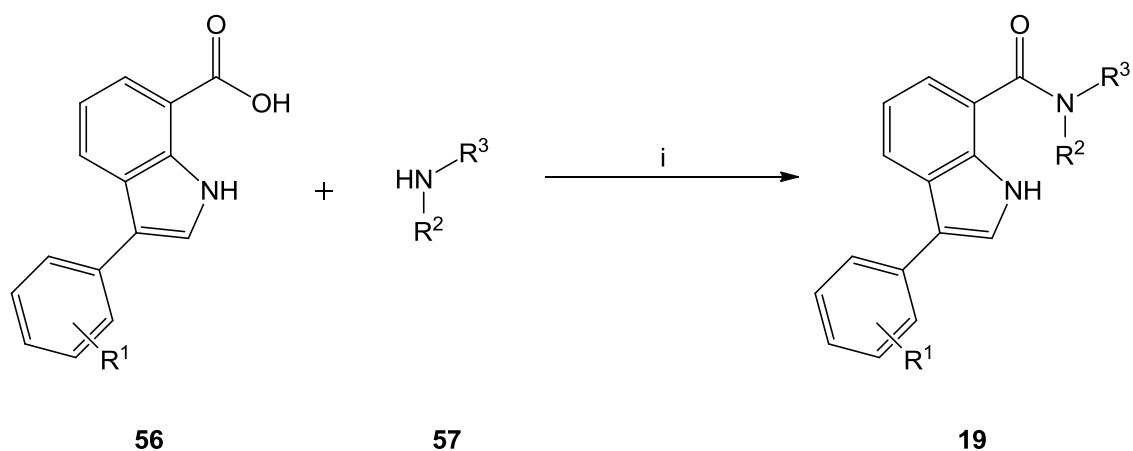
Zur Herstellung der 3-Aryl-1*H*-indol-7-carbonsäuren **56** wurde die im Rahmen der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Synthese entwickelte Methode verwendet. Entsprechend wurde Verbindung **56a** aus 2-Hydrazinylbenzoesäure-Hydrochlorid **55** und Phenylacetaldehyddimethylacetal **37** in Eisessig synthetisiert, wohingegen die übrigen Derivate durch die Kombination der Wacker-Oxidation von Styrenen mit der Fischer-Indol-Synthese entstanden (Schema 4-25).



Schema 4-25: Zwei Wege zur Darstellung verschiedener 3-Aryl-1*H*-indol-carbonsäuren als Edukte für die Amid-Synthese; i: Eisessig, 95 °C, 3.5 h, 26.5%, ii: *tert*-Butanol, *p*-Benzochinon, PdCl₂(MeCN)₂, 3.5 h, 50 °C→80 °C, 7.7-21.2%.

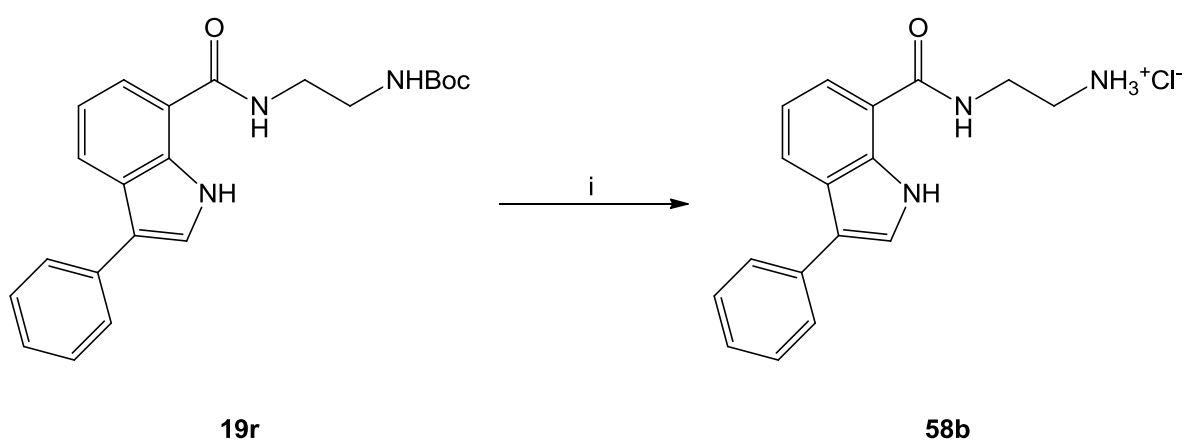
In einer Demethylierungsreaktion von **56b** analog zu der Darstellung von **17l** (Schema 4-14) konnte außerdem die 3-(3-Hydroxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure **56d** erhalten werden. Ebenso wie im Fall der Lactame fielen die Ausbeuten für die Indolcarbonsäuren eher mäßig aus, was sich auch hier mit der *ortho*-ständigen Carboxylgruppe erklären lässt.

Im nächsten Schritt wurden die Indolcarbonsäuren mit verschiedenen Aminen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt (Schema 4-26).



Schema 4-26: Amid-Synthese aus 3-Aryl-1H-indol-carbonsäuren **56** und verschiedenen Aminen **57** unter Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP®; i: DMF, PyBOP, DIPEA, RT, 1 h, 7.1-81.0%; R¹-R³: siehe Tabelle 6.

Nach einer erstmals von COSTE *et al.* für die Peptid-Synthese beschriebenen Methode wurde die Amid-Kupplung mit Hilfe von Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP®) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Kupplungsreagenz, das die Carbonsäure-Funktion durch Bildung eines reaktiven Intermediats für die Reaktion mit dem Amin aktiviert. Die verminderte Giftigkeit von PyBOP® stellt einen Vorteil beispielsweise gegenüber dem alternativ einsetzbaren BOP dar, bei dem es während der Verwendung zur Freisetzung des krebserregenden Hexamethylphosphorsäureamids (HMPA) kommt.⁹⁰⁻⁹²

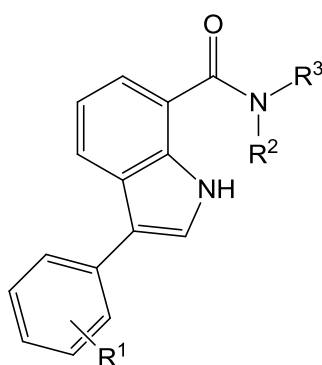


Schema 4-27: Entschützung des Boc-Amins durch Trifluoressigsäure (TFA) am Beispiel des Ethylendiaminmonoamids **58a**; i: CH₂Cl₂, TFA, RT, 1h, 24.4%.

Für die Umsetzung von bifunktionellen Aminen wurden die einfach Boc-geschützten Derivate verwendet, um eine zweifache Reaktion mit der Carbonsäure zu unterbinden. Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurden die entsprechenden Amide mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan umgesetzt (Schema 4-27). Nach Zugabe von Isopropanol-haltiger Salzsäure wurden die Amine in Form ihrer Hydrochloride isoliert.^{93, 94} Auf diese Weise konnten das *N*-(2-Aminoethyl)-3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamid-Hydrochlorid **58b** und das (3-Phenyl-1*H*-indol-7-yl)(piperazin-1-yl)methanon-Hydrochlorid **58a** dargestellt werden.

Die Demethylierung zur Darstellung der Hydroxy-Verbindungen **19f** und **19i** wurde, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, mit Bortribromid durchgeführt. Im Fall des Methylamids **19f** wurde die Demethylierung auf der Stufe der Indolcarbonsäure vorgenommen, während dies bei dem Benzylamid **19i** erst im Anschluss an die Amid-Kupplung erfolgte.

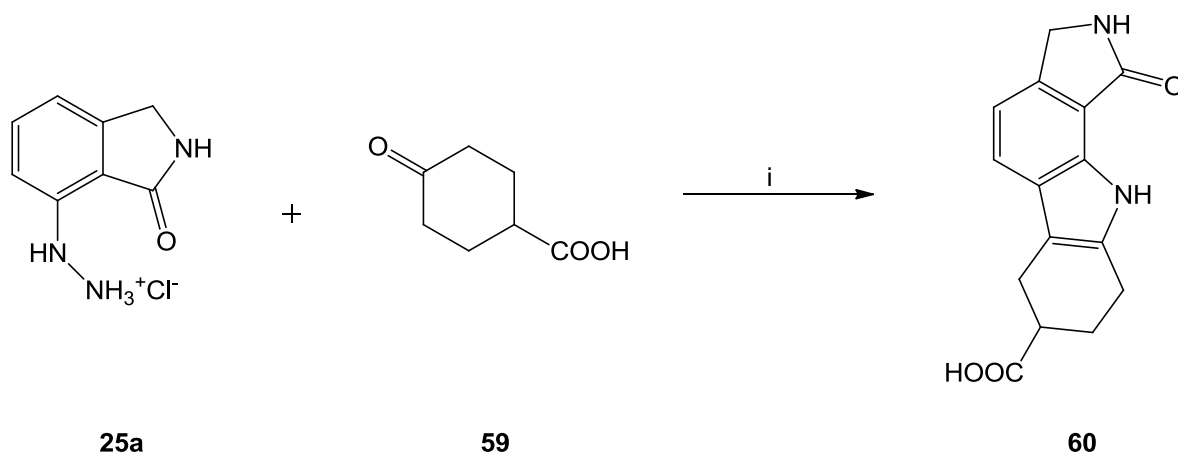
Alle durch Amid-Kupplung und gegebenenfalls folgende Entschützung synthetisierten Indolcarbonsäureamid-Derivate sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Mittels PyBOP® hergestellte Indolcarbonsäureamide **19** und **58**.**19a-p, 58a-b**

	R ¹	R ²	R ³
19a	H	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -	
19b	OCH ₃	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -	
19c	Cl	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -	
19d	H	CH ₃	H
19e	OCH ₃	CH ₃	H
19f	OH	CH ₃	H
19g	H	CH ₂ -Phe	H
19h	OCH ₃	CH ₂ -Phe	H
19i	OH	CH ₂ -Phe	H
19j	Cl	CH ₂ -Phe	H
19k	H	CH ₂ -3-Pyr	H
19l	OCH ₃	CH ₂ -4-Pyr	H
19m	OCH ₃	CH ₂ -3-Pyr	H
19n	OCH ₃	CH ₂ -2-Pyr	H
19o	OCH ₃	CH ₂ -2-F-Phe	H
19p	OCH ₃	4-Methyl-Phe	H
58a	H	-(CH ₂) ₂ -NH ₂ ⁺ Cl ⁻ -(CH ₂) ₂ -	
58b	H	C ₂ H ₄ NH ₃ ⁺ Cl ⁻	H

4.9 Synthese der 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure **60** und des Methylamids **61**

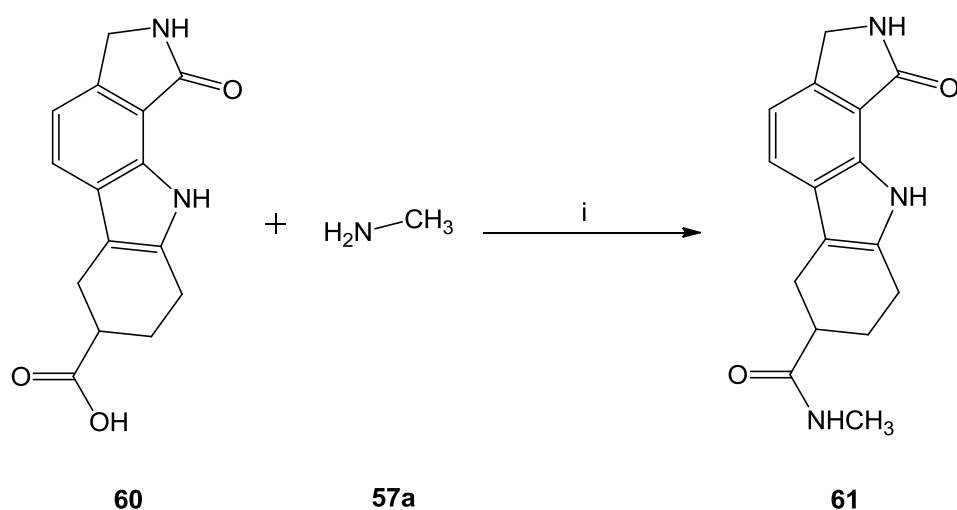
Verbindung **60** konnte analog zu den in Abschnitt 4.3 beschriebenen 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen durch eine Fischer-Indol-Reaktion in Eisessig synthetisiert werden (Schema 4-29).



Schema 4-28: Darstellung von **60** durch Fischer-Indol-Synthese aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid **25a** und 4-Oxocyclohexancarbonsäure **59**; i: Eisessig, 95 °C, 3.5h, 9.3%.

Durch Ersatz des Phenyl-Restes in Position 3 der Grundstruktur durch einen anellierten Cyclohexan-Ring werden die Rigidität des Moleküls erhöht und zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Seitenketten am Boden der ATP-Bindetasche ermöglicht. Die Carbonsäure-Funktion an 7-Position der Verbindung **60** bildete der *docking*-Pose nach außerdem eine Wasserstoffbrücke zu Glu169 aus der P-Schleife am oberen Eingang der ATP-Bindetasche aus.

Eine Amidierung der Carbonsäure erweitert diese Bindungseigenschaften, indem zusätzlich zu der Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion auch eine Donator-Funktion hinzugefügt wird. Die Darstellung gelang analog zu der Synthese der 3-Aryl-1*H*-indol-7-carboxamide (Kapitel 4.8) aus Methylamin unter Verwendung des Kupplungsreagenzes PyBOP® (Schema 4-29).

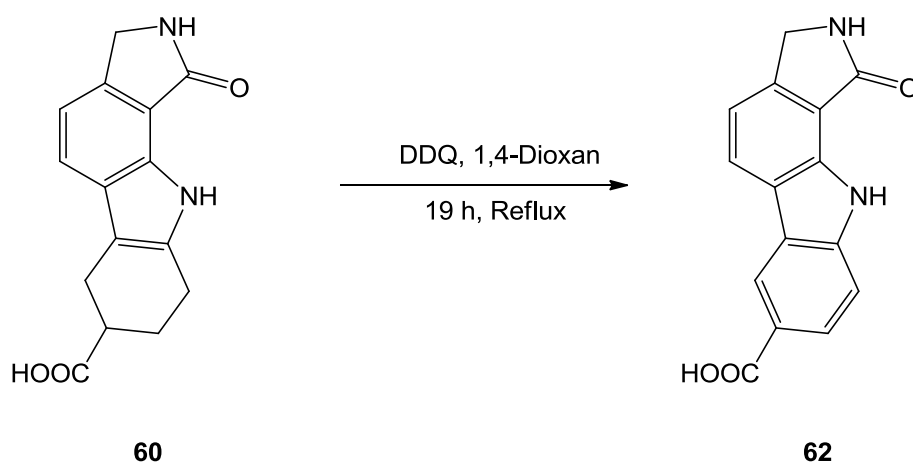


Schema 4-29: Darstellung des *N*-Methyl-1-oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carboxamids **61** aus Methylamin und der entsprechenden Carbonsäure mit Hilfe von PyBOP®; *i*: DMF, PyBOP, RT, 1h, 28.9%.

Sowohl die Carbonsäure **60** als auch das Amid **61**, weisen eine deutlich geringere Lipophilie als die 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one auf, die sich in niedrigeren cLogP-Werten zeigt und potentiell zu verbesserter Wasserlöslichkeit führen könnte.

4.10 Versuch zur Synthese von 1-Oxo-1,2,3,10-tetrahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure **62**

Um einen Vergleich zwischen dem teilweise aliphatischen Ringsystem in Verbindung **61** und einem im Gegensatz dazu vollständig planaren Ringsystem vornehmen zu können, wurde eine Aromatisierung des anellierten Cyclohexens durchgeführt. In einer oxidativen Dehydrogenierung mit Hilfe von 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) in 1,4-Dioxan konnte die aromatisierte Verbindung **62** hergestellt werden.⁹⁵ Eine ausreichende Reinigung des Rohprodukts blieb jedoch ohne Erfolg, sodass keine biologischen Daten für diese Verbindung vorliegen.



Schema 4-30: Aromatisierung des anellierten Cyclohexen-Strukturelements mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) zu Verbindung **62**; i: 1,4-Dioxan, DDQ, 19 h, Reflux.

5 Virtuelles Screening

Um größere Substanzbibliotheken nach potentiellen Inhibitoren für eine bestimmte Zielstruktur zu durchsuchen, stehen zwei grundsätzliche Ansätze zur Verfügung. Sofern die Verbindungen der Bibliothek bereits synthetisiert worden sind, kann ein Hochdurchsatz-Screening durchgeführt werden, bei dem eine größere Anzahl an Molekülen experimentell auf ihre Wirkung an der Zielstruktur getestet wird. Auf Grund des Fortschritts im Bereich der Automatisierbarkeit dieses Prozesses ist es heutzutage möglich, große Substanzbibliotheken innerhalb kurzer Zeit zu testen. Der zweite Ansatz besteht in einer ausschließlich theoretischen Beurteilung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Molekül die Zielstruktur inhibiert. Hierbei erfolgt die Durchführung vollständig mittels computergestützter Methoden, weshalb dieses Vorgehen auch als virtuelles Screening bezeichnet wird. Vorteilhaft an der theoretischen Evaluation ist, dass eine Synthese der Substanzen nicht nötig ist und dass im Vergleich zum experimentellen Hochdurchsatz-Screening sehr viel größere Moleküldatenbanken bewertet werden können. Insbesondere durch die Weiterentwicklung der Computertechnologie hat sich die Kapazität der Methode erhöht. Nur eine kleinere Anzahl von speziell ausgewählten Verbindungen muss im Anschluss daran noch praktisch untersucht werden um den Erfolg der theoretischen Voruntersuchungen bestätigen zu können und gegebenenfalls eine Leitstruktur für zukünftige synthetische Derivatisierung zu identifizieren.

Das hier durchgeführte virtuelle Screening kann in mehrere Phasen gegliedert werden, in denen die Anzahl an prozessierten Substanzen iterativ reduziert wurde, während die Komplexität der Bewertung und damit auch die benötigte Rechenleistung zunahm (Abbildung 29). Auf diesem Weg sollten strukturell neuartige CLK1-Inhibitoren identifiziert werden, die sich von den bekannten Verbindungen unterscheiden und das Potential für die Weiterentwicklung zu potenten, selektiven Hemmstoffen dieser Kinase haben.

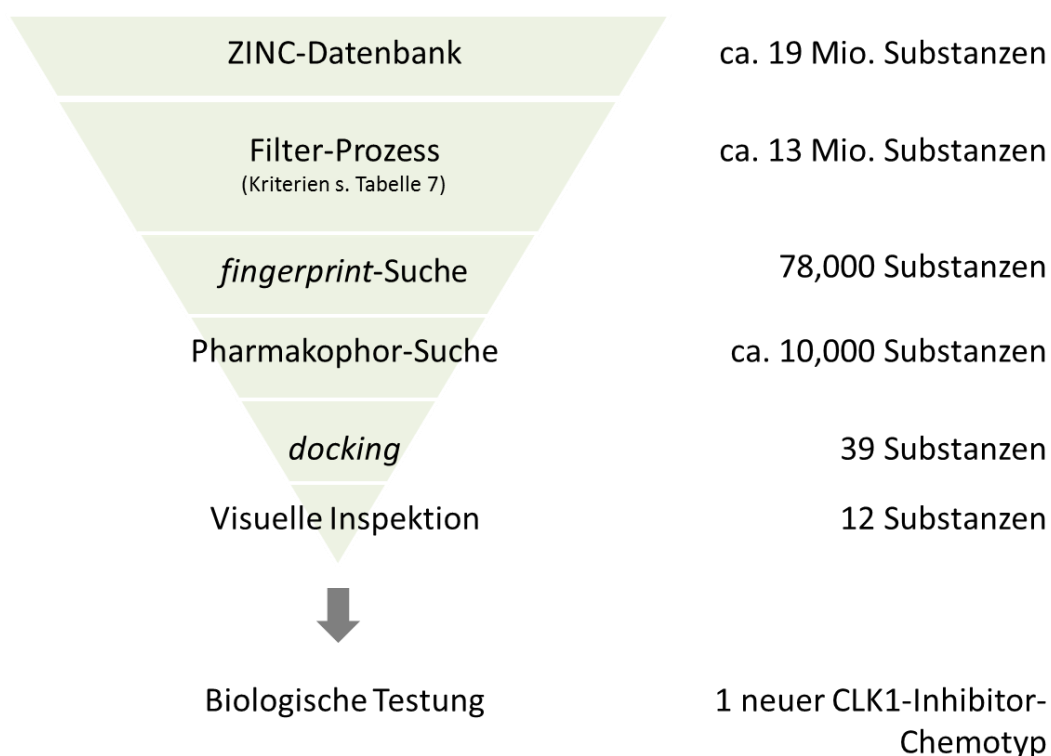


Abbildung 29: Schematische Übersicht über die während des virtuellen Screenings verwendeten Methoden und die Anzahl der nach jedem Schritt verbleibenden Bibliothekssubstanzen.

Als Bibliothek größtenteils kommerziell verfügbarer Substanzen wurde die ZINC-Standard-Datenbank als Quelle strukturell vielfältiger Verbindungen ausgewählt.⁹⁶ Diese ist im Internet frei verfügbar und umfasste zum Zeitpunkt der Untersuchungen ca. 19 Millionen Verbindungen im SMILES-Format.⁹⁷ Die Einträge der Datenbank stammen hauptsächlich (ca. 80%) aus den Katalogen verschiedener Lieferanten. Bei den übrigen Verbindungen handelt es sich um Substanzen für die bereits biologische Profile erstellt worden sind, die jedoch nicht kommerziell erworben werden können. Von den Betreibern wurden lediglich die Moleküle in die Datenbank aufgenommen, die den von IRWIN *et al.* definierten Kriterien entsprachen. So sind in den Verbindungen beispielsweise nur die Elemente H, C, N, S, O, F, Cl, Br, I, S, P und Si erlaubt.⁹⁶ Da die ZINC-Datenbank dennoch Moleküle enthielt, die auf Grund ihrer chemischen oder physikalischen Eigenschaften nicht als Wirkstoff geeignet waren, wurde zunächst ein Filterprozess mit dem *workflow*-Programm Pipeline Pilot durchgeführt.⁹⁸ Die gewählten Filterkriterien orientierten sich unter anderem an der von LIPINSKI *et al.* aufgestellten *rule of five*, bei der die Wasserstoffbrückenbindungskapazität, die Lipophilie und die molare Masse in die Bewertung einfließen (Tabelle 7).⁴⁹ Außerdem wurden gegebenenfalls vorhandene Ladungen oder Stereozentren basierend auf den

Standardeinstellungen des Programms vereinheitlicht und Salzfragmente aus den Moleküldaten entfernt. Insgesamt konnte die Substanzbibliothek um ca. 30% reduziert werden und wurde in der so erhaltenen Form für die folgende *fingerprint*-Suche eingesetzt.

Tabelle 7: Parameter, die für das Filtern der initialen ZINC-Datenbank verwendet wurden.

Filter	Wert
Molekulare Masse [g/mol]	≤ 400
logD	≤ 5.5
Anzahl rotierbarer Bindungen	≥ 1
Anzahl der kleinsten Ringe im kleinsten Ringsystem	≤ 5
Anzahl der Fragmente bei Entfernung aller Nicht-Ringbindungen	≤ 3

5.1 Fingerprint-Suche

Bei der *fingerprint*-Suche handelt es sich um eine zweidimensionale Methode, die zwar die Bindungsverhältnisse in den betrachteten Molekülen einbezieht, in der jedoch die dreidimensionale Raumstruktur der Verbindungen nicht berücksichtigt wird. Daher bietet sich diese Methode als eine wenig rechenintensive Möglichkeit an, die Größe von Datenbanken zu verringern und eine Substanzbibliothek auf die jeweilige Problemstellung zu fokussieren. Sie wird zu den Liganden-basierten Methoden gezählt, da die Information, die für die Suche nach aktiven Substanzen verwendet wird, sich von der Struktur bereits bekannter Inhibitoren ableitet. Informationen über den Aufbau des Zielproteins sind dabei nicht primär relevant. Ausgehend von einem oder mehreren bekannten Inhibitoren wird in diesem Verfahren in einer Datenbank nach ähnlichen Substanzen gesucht. Gleichzeitig ist es aber das Ziel, eine sich von den Template-Substanzen strukturell unterscheidende Verbindung zu identifizieren, denn die Ähnlichkeit soll sich hier lediglich auf die abstrahierten Eigenschaften beziehen, nicht aber auf die molekulare Struktur. Dieser Prozess wird auch als *scaffold-hopping* (Gerüstwechsel) bezeichnet, da der Grundkörper, auf dem die Suche basiert, gegen eine neuartige Struktur ausgetauscht werden soll. Im ersten Schritt werden dabei *fingerprints* sowohl der Template-Moleküle als auch der Datenbank-Moleküle erstellt, welche aus Zahlenreihen bestehen, in denen alle benötigten Informationen über den Aufbau eines jeden Moleküls kodiert sind und die somit deren Eigenschaften repräsentieren. Zur Generierung dieser *fingerprints* stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die zu verschiedenen Ergebnissen führen und deshalb passend für den jeweiligen Zweck ausgewählt

werden müssen. Um Datenbanken hinsichtlich potentiell biologisch aktiver Moleküle zu durchsuchen, die sich in ihrem Grundgerüst von der Referenz unterscheiden, eignen sich insbesondere die sogenannten *extended connectivity fingerprints* (ECFPs).^{99, 100} Hierbei wird die Distanz um ein Ausgangsatom des betrachteten Moleküls schrittweise radial erweitert und die Eigenschaften des erfassten Bereichs als Zahlenfolge kodiert gespeichert. Die Distanz von eins schließt dabei das Ausgangsatom und die daran angeschlossene Bindung ein. An dem Kohlenstoffatom an Position 3 des Indolringsystems in **17a** lässt sich die Erstellung des *fingerprints* beispielhaft erklären (Abbildung 30). Zunächst werden ausschließlich das Start-Kohlenstoffatom selbst und die Bindungen, die es eingeht, betrachtet. Im nächsten Schritt wird der Radius um eins erweitert, sodass alle Atome, die direkt an das Ausgangskohlenstoffatom gebunden sind und auch deren Bindungen mit einbezogen werden. So wird weiter verfahren, bis die Distanz ausreicht um das gesamte Molekül beschreiben zu können oder bis eine zuvor definierte maximale Distanz erreicht wird. Der Grad der Restriktion in der Datenbank-Suche erhöht sich mit der Länge der gewählten maximalen Distanz. Demnach werden für Suchen nach struktureller Ähnlichkeit geringere Distanzen gewählt um eine größere Bandbreite an Resultaten zu erhalten. Für die Aktivitäts-bezogene Suche sind dagegen oft längere Distanzen günstiger, wobei allerdings eine zu starke Einschränkung zu einem Verlust an Vielfalt führt. Aus diesem Grund wurde in der Suche nach CLK1-Inhibitoren eine Distanz von vier gewählt, was einer Anzahl von zwei Iterationen entspricht (Abbildung 30, blaue Kreise).

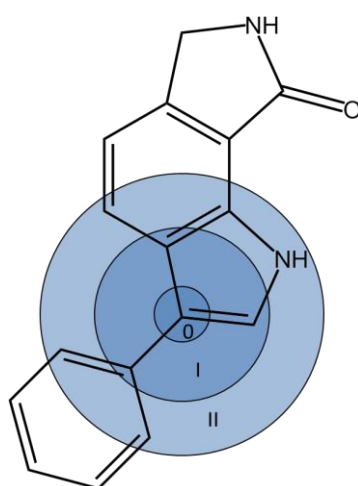


Abbildung 30: Darstellung der iterativen Erweiterung (Blaustufen) des bei der Erstellung eines *fingerprints* betrachteten Bereichs um ein Atom am Beispiel des Kohlenstoffatoms an Position 3 (Distanz = 1) der Verbindung **17a**.

Die auf diesem Weg für jeden Schritt erstellten Eigenschaftslisten der jeweiligen Fragmente werden zu dem *fingerprint* des Gesamtmoleküls hinzugefügt, nachdem überprüft wurde, dass dieser nicht bereits eine identische Eigenschaftsliste enthält. Jedes Atom des Moleküls wird auf diese Weise beschrieben, sodass der finale *fingerprint* immer das gesamte Molekül charakterisiert, auch wenn die gewählte maximale Distanz nur über wenige Bindungen reicht. Es wurde gezeigt, dass die besten Ergebnisse in einer 2D-*fingerprint*-Suche durch die Verwendung mehrerer Template-Verbindungen erhalten wurden, bei denen es sich möglichst, aber nicht zwingend um aktive Substanzen der gleichen oder verschiedener Klassen handeln sollte.¹⁰¹ Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die von DETERMANN⁴⁸ synthetisierten Strukturen **18** in Kombination mit Verbindung **17a-e**, **17k** und **22a** eingesetzt, obwohl erstere lediglich moderate Aktivität an der CLK1 zeigten. Um zusätzlich die Wahrscheinlichkeit der Identifikation eines neuen Grundkörpers (*scaffold-hoppings*) zu erhöhen, wurde außerdem die Methode der multiplen Fragment-Verbindung in MOE genutzt. Dabei wurden zwei Fragmente, die Interaktionen mit der ATP-Bindetasche eingehen, über Verbindungsstücke (*linker*) zu mehreren künstlichen Molekülen verbunden (Abbildung 31).

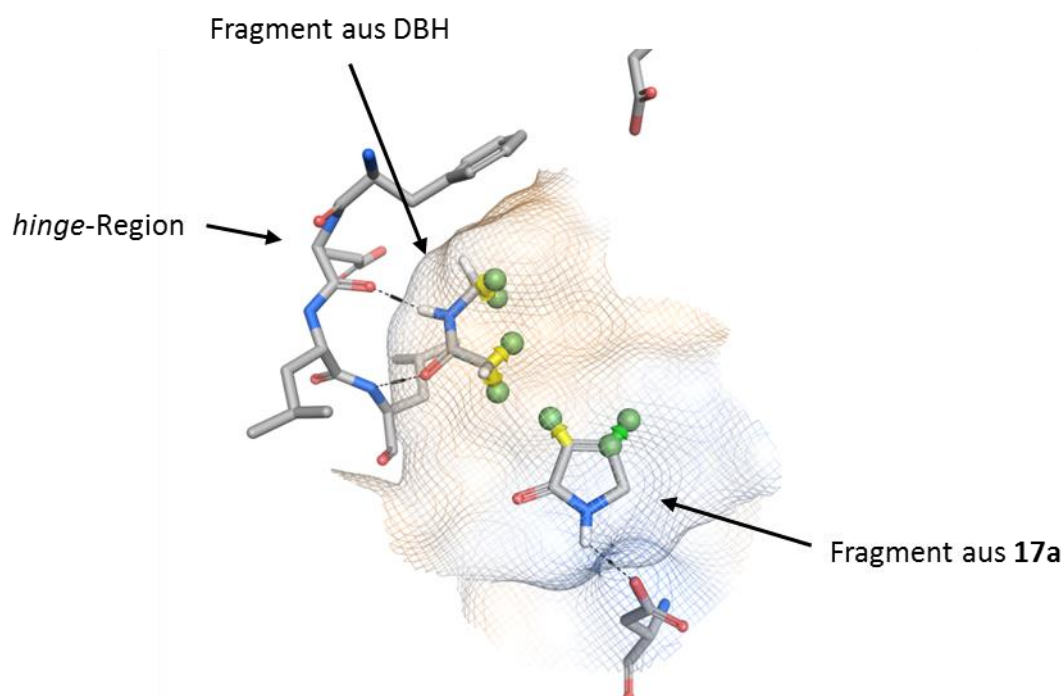


Abbildung 31: ATP-Bindetasche der CLK1 (PDB: 1Z57) mit den für die Fragment-Verbindung ausgewählten Fragmenten; Grüne Sphäre: Verknüpfungspunkt, gelbe Pfeile: mögliche Verknüpfungspunkte, grüner Pfeil: essentieller Verknüpfungspunkt; Gitternetz: Oberfläche der Bindetasche, orange: lipophil, blau: hydrophil.

Das eine Fragment bestand aus der Amid-Funktion des Lactam-Strukturelements von DBH, wobei die sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatome als Anknüpfungspunkte für die *linker* definiert wurden. Von einer ungewöhnlichen *docking*-Pose des 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons **17a**, in der über die Lactam-Struktur eine Wasserstoffbrücke zu Asp250 ausgebildet wurde, leitete sich das zweite eingesetzte Fragment ab. Hierbei wurde der gesamte Pyrrolidinon-Ring verwendet und als Anknüpfungspunkte die sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome gewählt. Während der Generierung künstlicher Moleküle, bei denen beide Fragmente miteinander verbunden sind, wurden verschiedene Parameter als Filter eingesetzt. Beispielsweise wurden reaktive Gruppen ausgeschlossen und pharmakophore Elemente in die Bewertung der Eignung einbezogen. Auf Grund der chemischen und physikalischen Eigenschaften eigneten sich die resultierenden Strukturen dennoch nicht als potentielle Wirkstoffe. Um deren Bindungseigenschaften jedoch trotzdem einbringen zu können, wurden sie ebenfalls als Template-Verbindungen in der *fingerprint*-Suche eingesetzt. So wurde die Vielfältigkeit der resultierenden Datenbank weiter vergrößert.

Eine Abwandlung des ECFP stellt der FCFP, der *functional-class fingerprint*, dar, der hier Verwendung fand. Im Unterschied zum ECFP werden die Atome nicht anhand ihres Elements, sondern anhand ihrer Eigenschaften im Molekül charakterisiert, sodass beispielsweise sowohl Chlor als auch Brom unter die Kategorie „Halogen“ fallen. Insgesamt wurden sechs Kategorien definiert, in denen für jedes Atom des Moleküls eine Aussage getroffen werden muss. Die Atome können als Wasserstoffbrückenakzeptor, Wasserstoffbrückendonator, negativ oder positiv ionisierbar, aromatisch und als Halogen charakterisiert werden, wobei es jedoch auch möglich ist, dass keine der Aussagen zutrifft. Für den als Beispiel gewählten Kohlenstoff in Verbindung **17a** ist lediglich die Aussage „aromatisch“ korrekt (Abbildung 30). Der Vorteil dieser Form der Abstraktion ist die stärkere Loslösung von der konkreten chemischen Struktur der Template-Moleküle und die ausgeprägtere Konzentration auf die chemischen Eigenschaften. Dadurch können zwar Substrukturen innerhalb von Substanzbibliotheken weniger gut identifiziert werden, jedoch werden so strukturell vielfältigere Moleküle mit ähnlichen Eigenschaften erhalten.

Um die Ähnlichkeit der Template-Moleküle mit den Verbindungen der betrachteten Datenbank zu bewerten, müssen die jeweils erstellten *fingerprints* miteinander verglichen

und die gefundenen Übereinstimmungen quantifiziert werden. Am häufigsten wird zu diesem Zweck der Tanimoto-Koeffizient verwendet (Gleichung 1).

$$Tanimoto = \frac{c}{a + b - c}$$

Gleichung 1: Berechnung des Tanimoto-Koeffizienten für den Vergleich zweier Moleküle A und B; *c*: Eigenschaften, die in A und B vorhanden sind; *a*: Eigenschaften von Molekül A; *b*: Eigenschaften von Molekül B.¹⁰²

Aus der Gleichung lässt sich ableiten, dass Werte zwischen Null, bei keiner Übereinstimmung, und Eins bei vollständiger Übereinstimmung erhalten werden. Nachteilig bei dem Einsatz des Tanimoto-Koeffizienten ist die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Größe des betrachteten Moleküls. Molekülen mittlerer Größe wird dabei bevorzugt eine höhere Ähnlichkeit zugeordnet. Weiterhin muss beachtet werden, dass es bei Template-Molekülen, für deren Atome nur wenige der sechs Kategorien zutreffend sind, häufig zu einer geringeren Anzahl an als ähnlich erkannten Verbindungen aus der Datenbank kommen kann. Dennoch findet der Tanimoto-Koeffizient verbreitete Anwendung.^{97, 98}

5.2 Pharmakophor-Suche

Ebenso wie die *fingerprint*-Suche ist die Pharmakophor-Suche dem Liganden-basierten Ansatz des virtuellen Screenings zuzuordnen. Es handelt sich hierbei um die Analyse bekannter Hemmstoffe mit dem Ziel, gemeinsame Strukturmerkmale zu identifizieren, die für die Wirkung an der Zielstruktur Voraussetzung sind. Im Gegensatz zu der *fingerprint*-Suche wird bei der Erstellung eines Pharmakophors meist die dreidimensionale Raumstruktur der betrachteten Referenz-Moleküle berücksichtigt. Laut IUPAC-Definition besteht das Resultat jedoch nicht aus Angaben über spezifische Strukturelemente oder funktionelle Gruppen, sondern aus einer Beschreibung der essentiellen sterischen und elektronischen Eigenschaften, welche aktive Moleküle aufweisen müssen.¹⁰³ Zusätzlich zu den Informationen, die sich von den Liganden ableiten lassen, können Aspekte der Target-Struktur ebenfalls einbezogen werden, sofern diese bekannt ist. Auf Grund der detaillierteren Anforderungen, denen Datenbank-Moleküle entsprechen müssen, um als passende Liganden kategorisiert zu werden, findet eine weitere Reduktion des Datenbank-Umfangs statt.

Für die Erstellung eines Pharmakophor-Modells für CLK1-Inhibitoren in MOE wurde die Co-Kristallstruktur (PDB ID: 1Z57) von Debromohymenialdisin **7** in CLK1 herangezogen. Das

generierte Modell basierte hauptsächlich auf den Eigenschaften des Liganden DBH. Es wurde jedoch durch sterische Anforderungen, die sich aus der Kinase-Struktur ergaben, ergänzt. In Abbildung 32 sind die einzelnen Elemente des verwendeten Pharmakophor-Modells dargestellt. Sowohl die Struktur der ATP-Bindetasche als auch die Position des Liganden sind in dieser Abbildung lediglich zur Verdeutlichung der räumlichen Anordnung der pharmakophoren Elemente dargestellt, sind selbst aber nicht Teil des Modells.

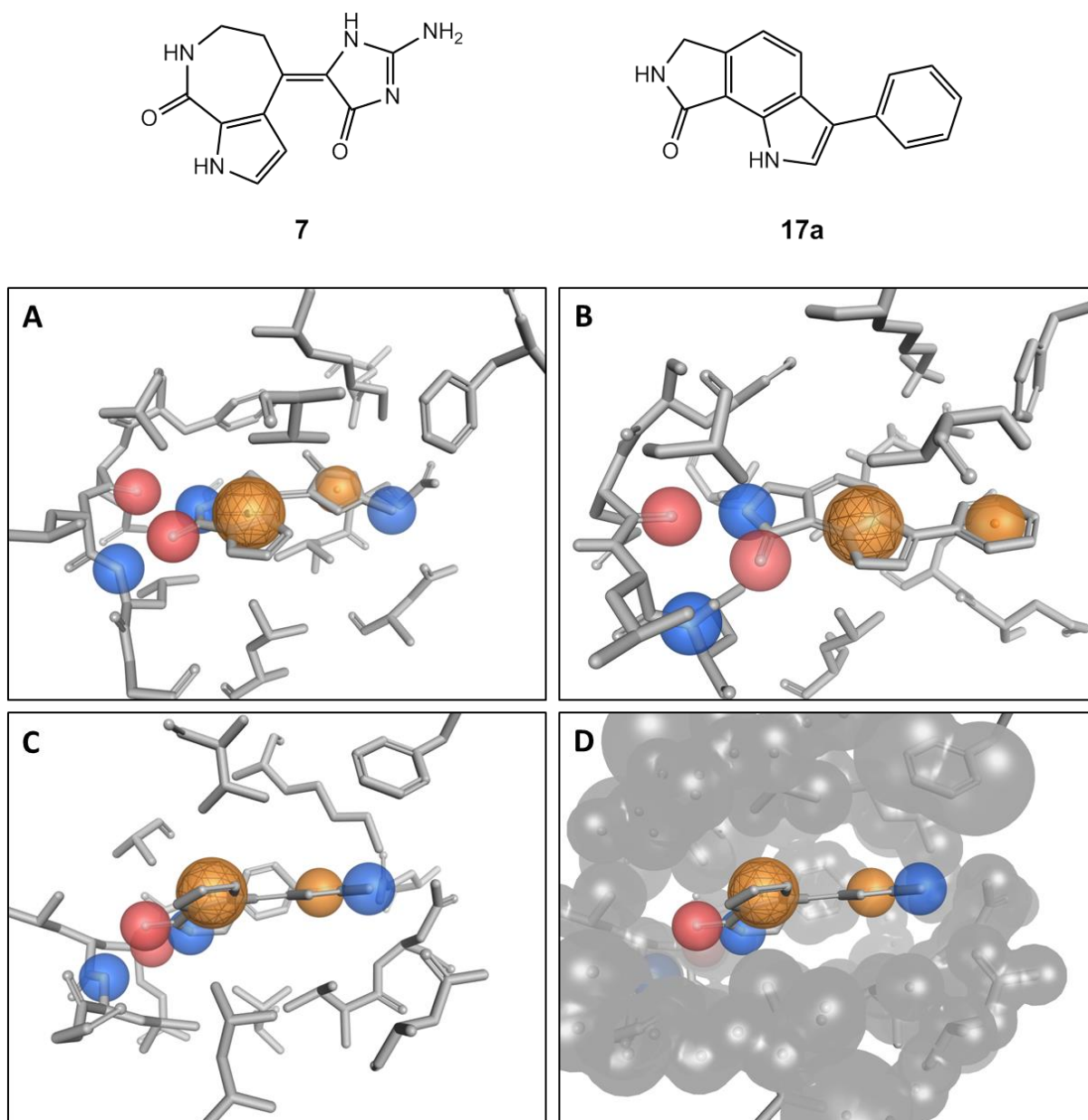


Abbildung 32: A, C, D: Unterschiedliche Darstellungen des für das virtuelle Screening erstellten Pharmakophor-Modells (MOE) basierend auf der Kristallstruktur von CLK1 mit DBH **7** (PDB: 1Z57). B: Pharmakophor-Modell basierend auf der *docking*-Pose von **17a** in CLK1; rot: Wasserstoffbrückenakzeptor, blau: Wasserstoffbrückendonator, orange: Aromat, graues Gitter: zu besetzendes Volumen, graue Sphären: verbotene Bereiche.

Als entscheidend für die Bindung von DBH an CLK1 werden die Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region über die Lactam-Struktur des Liganden angesehen, weshalb diese Funktionalität in das Pharmakophor-Modell übernommen wurde. Zusätzlich wurde festgelegt, dass jedes Molekül diese Elemente zwingend beinhalten muss, um dem Modell zu entsprechen. Außerdem wurden die Bindungspartner dieser Wasserstoffbrücken auf der Seite der Kinase räumlich spezifiziert, indem ein Akzeptor an dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Glu242 und ein Donator an dem Amid-Stickstoffatom von Leu244 definiert wurden. Das Zentrum der Bindetasche ist von hydrophoben Aminosäure-Seitenketten geprägt, sodass ein potentieller Ligand für optimale Wechselwirkungen an dieser Position ebenfalls lipophile Strukturelemente aufweisen sollte. Daher enthält das Modell im Bereich des Zentrums ein aromatisches Element, welches diesen Raum ausfüllen soll. Ebenso wurde an der Position der Amino-1*H*-imidazol-5(4*H*)-on-Partialstruktur ein aromatisches Element in dem Pharmakophor-Modell vorgesehen. Um nach Molekülen zu suchen, die wie DBH eine Wechselwirkung zum Aspartat (Asp325) des DFG-Motivs eingehen können, wurde ein zweiter Bereich um das Stickstoffatom der Amino-Gruppe von **7** als Wasserstoffbrückendonator definiert.

Ein Vergleich der anhand des Co-Kristallisats gewählten pharmakophoren Elemente mit den Elementen, die sich aus der *docking*-Pose von **17a** in CLK1 ableiten lassen, zeigt die Ähnlichkeit der Ergebnisse. In beiden Fällen sind die Interaktionen zur *hinge*-Region, sowie ein aromatischer Bereich im Zentrum vorhanden. Nur die zweite aromatische Sphäre ist leicht verschieden positioniert und das Bindungselement zum DFG-Motiv fehlt bei **17a** (Abbildung 32B). Auf Grund des Fehlens dieses Elements, welches Liganden mit erweitertem Interaktionspotential liefern könnte, wurde das Modell basierend auf dem Co-Kristalliat von DBH in CLK1 für die Suche in der vorprozessierten Datenbank verwendet. Neben dem restriktiven Pharmakophor-Modell, in dem zwei Wasserstoffbrücken zur *hinge*-Region als essentiell definiert wurden, wurde zusätzlich ein Modell verwendet in dem lediglich eine Wasserstoffbrücke zur *hinge*-Region gefordert war. Dadurch blieben im letzteren Fall ein breiteres Spektrum und eine größere Zahl an Substanzen in der Datenbank erhalten.

Da es sich bei dem Pharmakophor-Modell um eine Anordnung verschiedener Elemente im dreidimensionalen Raum handelt, ist die Konformation von Test-Substanzen entscheidend für die Beurteilung, ob die Anforderungen des Modells erfüllt werden oder nicht. Während des Vergleichs der Pharmakophor-Kriterien mit den Eigenschaften der Verbindungen in MOE

findet jedoch keine Variation der Konformation statt, sodass bereits zuvor für jeden Vertreter der Datenbank Konformationen generiert werden müssen. Die Anzahl an Konformeren pro Molekül und die Art der Erstellung kann das Ergebnis der folgenden Pharmakophor-Suche beeinflussen. Grundsätzlich sollte mit einer begrenzten Anzahl an Konformeren pro Molekül dessen gesamter Konformationsraum repräsentiert werden. Dabei muss beachtet werden, dass sich die biologisch aktive Konformation von der energetisch günstigsten Konformation der reinen Substanz unterscheiden kann.¹⁰⁴ Bei der stochastischen Konformer-Suche in MOE werden ungerichtet alle Bindungen des betrachteten Moleküls rotiert und tetraedrische Zentren invertiert. An diesen Vorgang schließt sich eine Energieminimierung der entstandenen Konformation sowie eine automatische Plausibilitätsbewertung basierend auf energetischen und geometrischen Parametern an. Erfüllt die gefundene Konformation die Anforderungen, wird sie in die Datenbank aufgenommen. Durch die Invertierung an tetraedrischen Zentren werden mit der stochastischen Konformer-Suche auch Enantiomere generiert. Besonders gut geeignet ist die Methode zur Identifizierung lokaler Minima in kleineren Molekülen, welche in der Datenbank im vorliegenden Fall dominieren. Nachteilig sind dagegen die geringe Effizienz und eine vergleichsweise große Anzahl benötigter Iterationen für die Erstellung eines Konformers.^{53, 105, 106} Die aus der *fingerprint*-Suche in ZINC resultierende Datenbank, sowie die auf Kinase-Inhibitoren spezialisierte Substanzbibliothek ChEMBL Kinase SARfari¹⁰⁷ wurden durch die Erzeugung von Konformeren in MOE mit Hilfe der stochastischen Methode unter Standardeinstellungen um die Konformere der einzelnen Datenbank-Moleküle erweitert. Darauffolgend konnte eine Pharmakophor-Suche durchgeführt werden, die Verbindungen innerhalb der Datenbanken identifizierte, welche die Anforderungen der entwickelten Pharmakophor-Modelle erfüllten. Aus der Summe dieser Substanzen wurde eine neue Bibliothek erstellt, die lediglich die am besten mit den Pharmakophor-Modellen übereinstimmende Konformation jedes Moleküls beinhaltete und aus ca. 10,000 Einträgen bestand.

5.3 Molekulares *docking*

Die Substanzbibliothek, die aus der Pharmakophor-Suche resultierte, enthielt nur noch weniger als 10% der in der ZINC-Standard-Datenbank vorhandenen Moleküle und war durch die unterschiedlichen Filterungsprozesse stark auf das Ziel der Identifikation von CLK1-Inhibitoren fokussiert. Auf Grund des reduzierten Umfangs konnte nun die rechenintensive

docking-Analyse der verbleibenden Substanzen mit der CLK1-Kristallstruktur (PDB: 1Z57) analog zu der in Kapitel 3 beschriebenen Methode durchgeführt werden. Als Ergänzung wurde zudem ein *docking* der ChEMBL Kinase SARfari – Datenbank vorgenommen. Die erhaltenen *docking*-Posen wurden, unter Berücksichtigung ihrer Einstufung durch die Bewertungsfunktion *chemscore*, in einer visuellen Inspektion hinsichtlich ihrer Plausibilität evaluiert. Dabei wurden die polaren Interaktionen zwischen Ligand und Protein, insbesondere an der *hinge*-Region, sowie hydrophobe Wechselwirkungen und die globale Besetzung der Bindetasche berücksichtigt. Außerdem wurde die Konformation des Liganden bewertet.

Basierend auf diesen Betrachtungen wurden aus einer durch Vorselektion erhaltenen Gruppe von 39 Strukturen zwölf Verbindungen für die biologische Evaluation an CLK1 und an verwandten Kinasen der CMGC-Familie ausgewählt (Anhang: Tabellen mit biologischen Daten, Tabelle 47).

5.4 Biologische Evaluation ausgewählter Screening-Substanzen

Die biologische Testung der zwölf bei der visuellen Inspektion am besten bewerteten Verbindungen aus dem virtuellen Screening an CLK1 lieferte lediglich eine aktive Substanz. Abbildung 33 zeigt eine Auswahl der interessantesten Vertreter. Obwohl die Verbindungen im Verlauf des Screenings ähnliche chemische Eigenschaften zeigten, ist die strukturelle Diversität deutlich erkennbar. Bei Verbindung **64** handelt es sich um ein Derivat der erstmals von KUNICK *et al.* synthetisierten Paullone, welche sich in der Vergangenheit bereits als Kinase-Inhibitoren bewährt haben.^{108, 109}

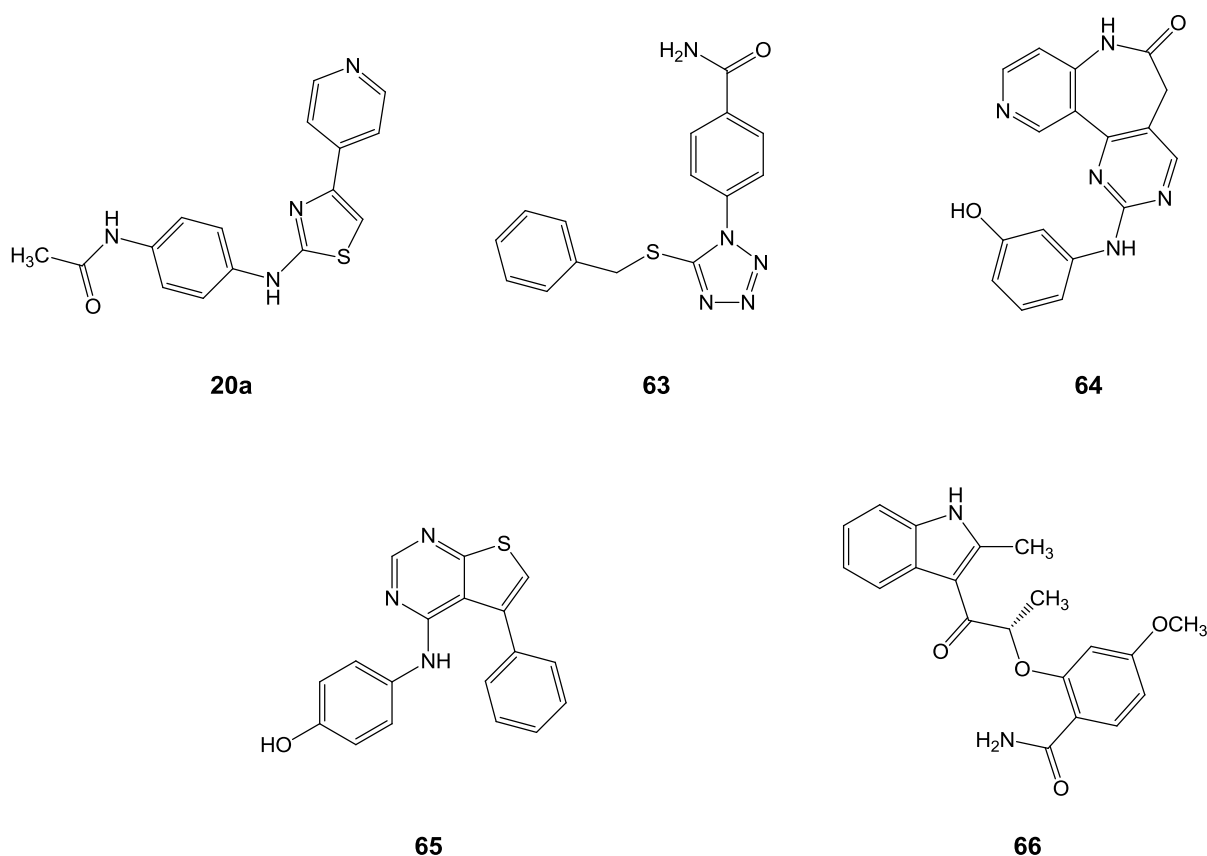


Abbildung 33: Ausgewählte Verbindungen aus dem Satz der biologisch evaluierten Screening-Substanzen.

Auch hier konnte die inhibitorische Aktivität von **64** und der verwandten Verbindung **71** an CDK-Kinasen, sowie an CK1 gezeigt werden, jedoch waren die Substanzen an CLKs und DYRKs inaktiv. Das Thiazol-Derivat **20a** zeigte als einzige Verbindung Aktivität an der CLK1 im einstellig mikromolaren Bereich (Abbildung 34A). In allen mit GOLD erstellten *docking*-Posen wird eine Wasserstoffbrücke von dem Pyridin-Stickstoffatom zu dem Amid-Stickstoffatom der *gk+3* Aminosäure Leu244 in der *hinge*-Region ausgebildet (Abbildung 34B-D). Dadurch bedingt befindet sich der Thiazol-Ring immer im Zentrum der Bindetasche, wobei das Schwefelatom in Richtung der α C-Helix weist. Weiterhin bleibt eine Wasserstoffbrücke über die Amid-Gruppe zu Glu169 in jedem der vorhergesagten Bindemodi erhalten. In der in Abbildung 34B dargestellten Pose findet diese Interaktion zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden und dem Proton des Amid-Stickstoffatoms an Glu169 statt. Gleichzeitig ermöglicht die Position des Protons am Anilid-Stickstoffatom die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu Asp250 am Eingang der ATP-Bindetasche. Die Orientierung des Phenyl-Restes erlaubt keine Wechselwirkungen mit der Phenyl-Seitenkette des Phe172 aus der P-Schleife.

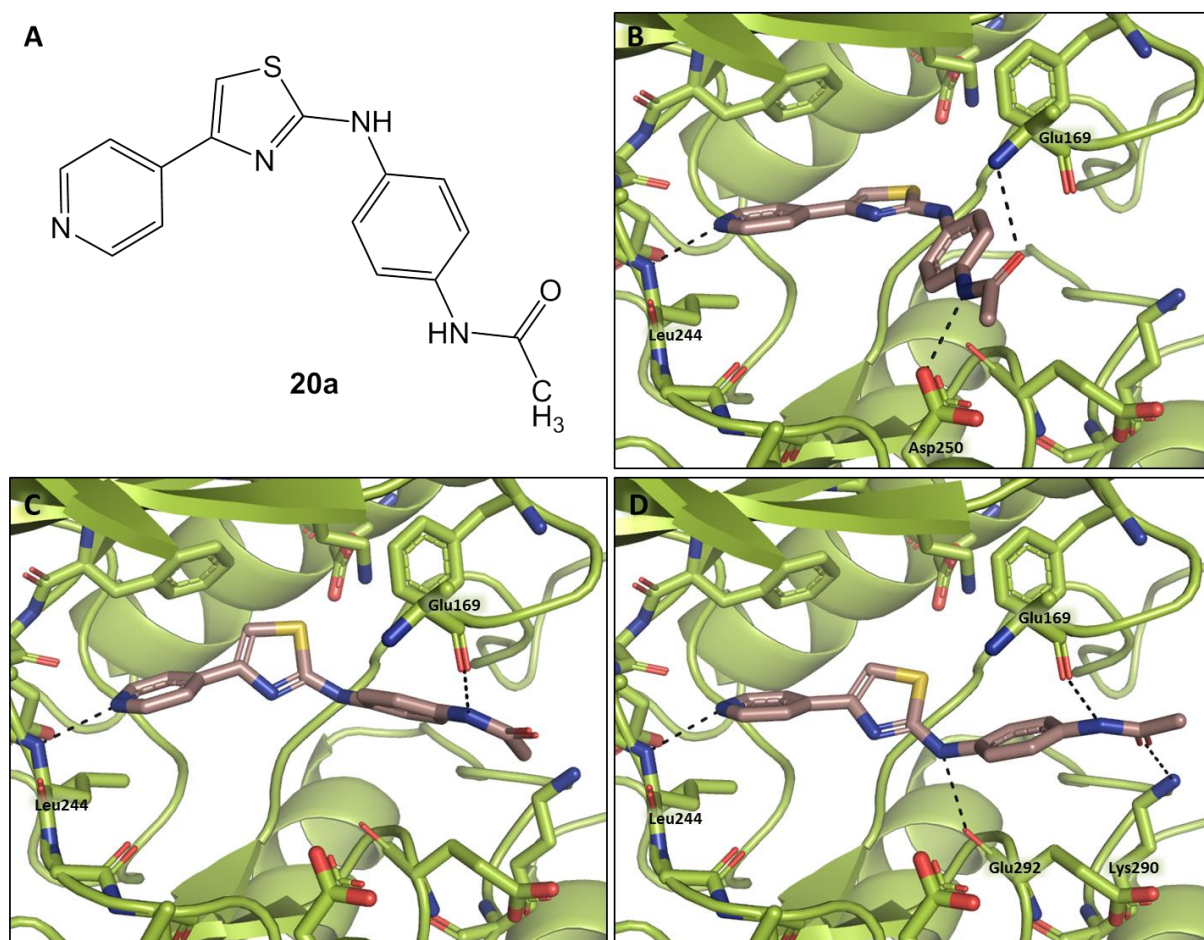
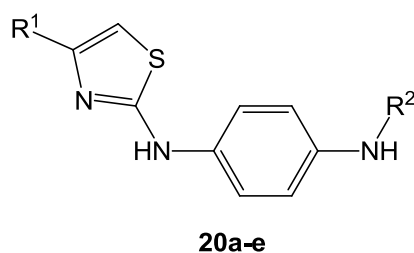


Abbildung 34: A: Screening-Hit **20a**; B-D: Mittels *docking* mit GOLD vorhergesagte mögliche Bindemodi von **20a** in CLK1 (PDB: 1Z57); *unterbrochene schwarze Linie*: Wasserstoffbrückenbindungen; zur Verbesserung der Sichtbarkeit des Liganden sind Leu167 und Gly168 der P-Schleife nicht dargestellt; die Koordinaten der Seitenkette von Glu169 sind in der verwendeten PDB-Datei nicht vollständig enthalten.

In den alternativen Posen C und D entsteht die Wasserstoffbrücke zu Glu169 im Unterschied zu Pose B zwischen dem Proton des Anilid-Stickstoffatoms des Liganden und dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Peptid-Bindung. Zusätzlich dazu sind bei Bindemodus D zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu Lys290 als auch zu Glu292 sichtbar, wodurch der Ligand stärker in der Bindetasche verankert wird. Der Phenyl-Rest des Liganden ist in den beiden letzteren Posen derart orientiert, dass eine *edge-to-face* Wechselwirkung zu der Seitenkette des Phe172 beobachtet werden kann.

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Verbindung **20a** zu erweitern und potentiell Derivate mit höherer Aktivität und Selektivität gegenüber CLK1 zu identifizieren, wurden zusätzlich die kommerziell verfügbaren Substanzen **20b-20e** biologisch evaluiert (Tabelle 8, Anhang: Tabelle 48).

Tabelle 8: Substitutionsmuster und IC₅₀-Werte [μM] für CLK1 und DYRK1A des mit Hilfe des virtuellen Screenings identifizierten CLK1-Inhibitors **20a** und der Derivate **20b-e**.



	R ¹	R ²	CLK1	DYRK1A	DYRK2
20a	4-Pyridyl	COCH ₃	4.1	3.2	nd ^a
20b	4-Pyridyl	H	3.3	1.8	0.38
20c	3-Pyridyl	COCH ₃	5.0	> 10	4.9
20d	2-Pyridyl	COCH ₃	> 10	> 10	> 10
20e	Phenyl	COCH ₃	> 10	> 10	> 10

^a nd: nicht bestimmt.

Es zeigte sich, dass das Stickstoffatom des Pyridin-Restes und dessen Position von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der Verbindungen an CLK1 ist. Der Ersatz des Pyridin-Rests durch einen Phenyl-Substituenten in **20e** führte zur Inaktivität der Substanz, obwohl über die Amid-Funktion weiterhin Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden konnten. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese über die Orientierung in der ATP-Bindetasche und die Wichtigkeit der Wasserstoffbrücke, welche das Pyridin-Stickstoffatom zur *hinge*-Region ausbildet. Eine weitere Bestätigung liefert die Veränderung der hemmenden Wirkung in Abhängigkeit der Position des Stickstoffatoms innerhalb des Pyridin-Rings. Verbindung **20d**, bei der ein 2-Pyridyl-Substituent eine Wasserstoffbrückenbindung zur *hinge*-Region nicht ermöglicht, ist inaktiv. Abbildung 35 (links) zeigt, dass sich der Pyridin-Ring zwar an der gleichen Position in der ATP-Bindetasche befindet, jedoch das Stickstoffatom unabhängig von der Ring-Rotation nicht in Richtung der *hinge*-Region sondern zum Zentrum der Bindetasche ausgerichtet ist. Dagegen bleibt über die *N*-(4-aminophenyl)acetamid-Struktur eine ausgeprägte Wechselwirkung zu der Kinase erhalten. Obwohl Wasserstoffbrücken zu Lys290, Glu292 und Gly169 ausgebildet werden und die *edge-to-face* Interaktion mit der Seitenkette von Phe172 ebenfalls möglich bleibt, konnte dennoch keine hemmende Wirkung an CLK1 beobachtet werden.

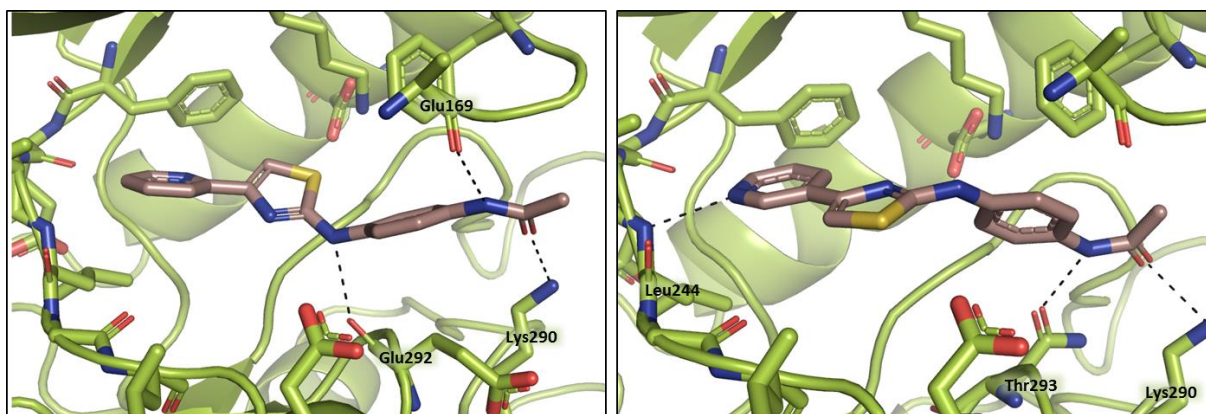


Abbildung 35: Docking-Ergebnisse für die *N*1-(Thiazol-2-yl)benzen-1,4-diamine, welche an Position 4 des Thiazol-Ringes einen Pyridin-Rest tragen; links: *N*-(4-((4-(Pyridin-2-yl)thiazol-2-yl)amino)phenyl)acetamid **20d**, rechts: *N*-(4-((4-(Pyridin-3-yl)thiazol-2-yl)amino)phenyl)acetamid; unterbrochene schwarze Linie: Wasserstoffbrückenbindungen.

Im Vergleich ist der Bindemodus von Verbindung **20c**, welche einen 3-Pyridyl-Rest an Position 4 des Thiazols trägt, dargestellt (Abbildung 35, rechts). Die grundsätzliche Orientierung ist ähnlich, allerdings liegt der Thiazol-Ring im Zentrum der Bindetasche um 180° horizontal gedreht vor. Zusätzlich ist auch die Konformation des *N*-(4-Aminophenyl)acetamid-Rests verändert, sodass zwar über das Carbonylsauerstoffatom des Anilids eine Wasserstoffbrücke zu Lys290 ausgebildet werden kann, aber das Proton am Stickstoffatom eine Interaktion mit Thr293 anstelle von Gly169 eingeht. Die sekundäre Amino-Gruppe hingegen ist aufgrund ihrer veränderten Position nicht mehr am Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen zu der Kinase beteiligt. Bei dem Anilin-Derivat **20b** wurde die höchste Aktivität an CLK1 (IC₅₀-Wert: 3.3 µM) innerhalb der getesteten Thiazol-Derivate gefunden. Anhand der *docking*-Analyse ist zu vermuten, dass sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Protonen der aromatischen Aminogruppe und Asp250 ausbildet, die nicht durch sterische Behinderung einer Acyl-Funktion geschwächt wird. Wie im Fall von Verbindung **20a** ist die Hemmwirkung an den Kinasen der DYRK-Familie stärker ausgeprägt als die Inhibition von CLKs. Nachteilig ist außerdem die verminderte Selektivität gegenüber CDK9/cyclin T.

Mit der Identifikation der *N*1-(4-(Pyridyl)thiazol-2-yl)benzen-1,4-diamine **20** als CLK und DYRK-Inhibitoren durch das virtuelle Screening konnte gezeigt werden, dass die verwendete Kombination der unterschiedlichen Computer-gestützten Methoden geeignet war, um aktive Verbindungen aus einer großen Molekül-Datenbank zu filtern. Der *N*-(Thiazol-2-yl)benzen-

1,4-diamin-Grundkörper kann nun als Ausgangspunkt für die Synthese von Derivaten dienen, die hinsichtlich ihrer Aktivität und Selektivität verbesserte Eigenschaften aufweisen.

6 Erstellung von Inhibitor-Protein-Co-Kristallstrukturen

Die Anfertigung von Protein-Co-Kristallstrukturen dreier 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one mit CLK1 und CLK3 sollte zur Bestätigung der mittels *docking* aufgestellten Hypothese über den Bindemodus dieser Inhibitor-Klasse in der ATP-Bindetasche der CLK-Kinasen dienen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Knapp (*SGC, University of Oxford, UK*) konnten Co-Kristallstrukturen von **17l** und **54** mit CLK1, sowie eine Co-Kristallstruktur von **17a** mit CLK3 erstellt werden.

6.1 Röntgenkristallstruktur von CLK1 mit 17l

Um das CLK1-Protein zu gewinnen, wurde das vorgefertigte Konstrukt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Nach der Selektion der Plasmid-haltigen Bakterienzellen mittels Antibiotika-Resistenzen wurden diese inkubiert, bis eine für die Proteinproduktion geeignete Zellmasse entstanden war. Über die Zugabe von IPTG wurde das Lactose-Operon, welches innerhalb des Plasmids den Promotor des CLK1-Gens reguliert, aktiviert und das Kinase-Protein exprimiert. Im Anschluss an eine weitere Inkubationszeit wurde das CLK1-Enzym durch Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall und anschließender Aufarbeitung via Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie in gereinigter Form gewonnen.

Für die Kristallisationsversuche wurde die Methode des „sitzenden Tropfens“ (*sitting drop*, Abbildung 36) gewählt, bei der sich das Gemisch aus Präzipitant, Protein und Inhibitor in Form eines Tropfens am Boden eines *wells* befindet. Als Präzipitant wird eine Lösung verschiedener Bestandteile bezeichnet, die dazu dient, die Kristallisation des Proteins einzuleiten. Unter anderem werden zu diesem Zweck anorganische und organische Salze, Polyole und Polyethylenglycole verschiedener Kettenlänge verwendet. Von Nachteil bei dieser Methode kann nach erfolgter Kristallbildung die Anhaftung des Kristalls am Gefäßboden sein. Alternativ steht in diesem Fall die Methode des „hängenden Tropfens“ zur Verfügung, die jedoch eine höhere Komplexität in der Durchführung bedingt. Hierbei befindet sich der Tropfen an der Verschluss-Folie des *wells*.¹¹⁰

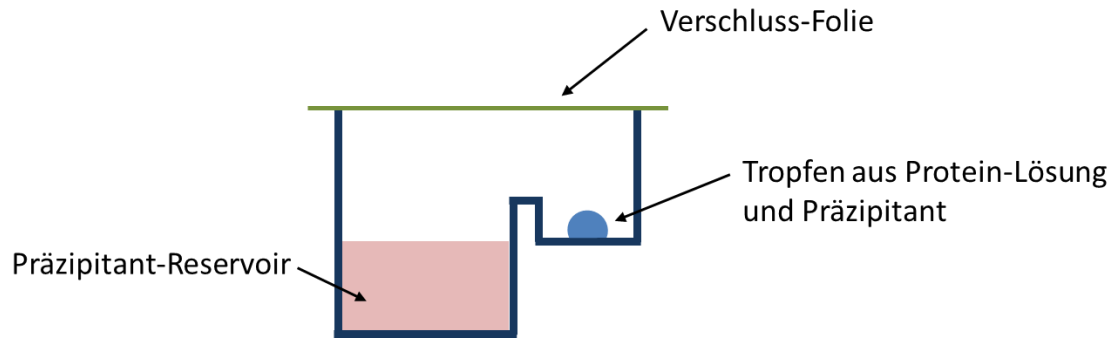


Abbildung 36: Kristallisationsmethode des "sitzenden Tropfens".

Während der Inkubationszeit des Tropfens, welcher Protein-Lösung und Präzipitanten-Lösung enthält, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen diesem und einem Reservoir des reinen Präzipitanten ein. Da es sich um ein abgeschlossenes System handelt und der Gasaustausch mit der Umgebung durch die Verschlussfolie verhindert wird, ist dieses Gleichgewicht unabhängig von der Umgebungsluft. Auf Grund der geringeren Konzentration des Präzipitanten innerhalb des Tropfens im Vergleich zu der Konzentration im Reservoir findet eine Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten aus dem Tropfen statt. Der vorhandene Konzentrationsunterschied ist auf die Verdünnung, die durch die Protein-Lösung verursacht wird, zurückzuführen. Letztlich erhöht sich auf diesem Weg die Präzipitant-Konzentration im Tropfen, sodass es zur Präzipitation des Proteins kommt, wodurch sich sowohl erwünschte Kristall-Keime als auch unerwünschte amorphe Niederschläge bilden können. Für die Vermessung mit Hilfe von Röntgenstrahlen sind amorphe Präzipitate allerdings ungeeignet. Ob sich Kristall-Keime bilden, hängt von den Versuchsbedingungen und den Proteineigenschaften ab. Das Kristallwachstum erfolgt in drei Phasen: Zunächst bildet sich ein Kristallisationskeim (*nucleus*), bei dem es sich um ein thermodynamisch stabiles Aggregat des Proteins handelt, welches eine Oberfläche für das anschließende Kristallwachstum bildet. In der folgenden Wachstumsphase kommt es zur Diffusion weiterer Moleküle zur Kristalloberfläche, an der sich diese dann geordnet anlagern. Das Wachstum wird beendet, sobald sich ein Gleichgewicht mit der Proteinkonzentration der umgebenden Lösung eingestellt hat oder die Oberfläche des Kristalls durch Verunreinigungen beziehungsweise Verschiebung des Kristallgitters gestört wird.¹¹⁰ Die Kristallisierbarkeit eines Proteins wird unter anderem durch dessen chemische Reinheit und Einheitlichkeit der Konformation bestimmt. Zudem spielen zahlreiche externe Einflussfaktoren eine wichtige Rolle. So wirken sich physikalische Faktoren wie Temperatur, Viskosität und Druck, sowie

chemische Faktoren, wie die Art und Konzentration des Präzipitanten auf die Kristallisierbarkeit aus.¹¹⁰

Zur Durchführung der Co-Kristallisation wurden verschiedene CLK1-Inhibitoren zu Aliquoten der Lösung des gereinigten CLK1-Proteins gegeben und mit unterschiedlichen Präzipitanten bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Damit die Anzahl der gleichzeitig getesteten Kristallisationsbedingungen möglichst hoch war, wurde im vorliegenden Fall eine 96-*well*-Platte verwendet, deren einzelne *wells* wiederum in drei *subwells* und ein Reservoir unterteilt waren. So konnten innerhalb eines *wells* drei unterschiedliche Volumenverhältnisse zwischen Präzipitant und Protein/Inhibitor-Lösung untersucht werden. Die Zusammensetzung des Präzipitanten, dessen Stammlösung sich im Reservoir befand, blieb dabei in den jeweiligen *subwells* gleich. Insgesamt konnten dadurch 288 Bedingungen gleichzeitig evaluiert werden. Bei der Verwendung einer Mischung aus PEG und Natriummalonat als Präzipitant konnte nach einer Woche die Bildung eines für die röntgendiffraktometrische Analyse geeigneten Kristalls eines Komplexes von CLK1 mit dem Inhibitor **17I** beobachtet werden.

Um einen Kristall für die Vermessung mittels Röntgenstrahlen vorzubereiten, wird er in der Lösung des Tropfens mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Damit der Kristall durch diesen Prozess nicht beschädigt wird, muss ein Kryoprotektionsmittel hinzugesetzt werden, bei dem es sich beispielsweise um Ethylenglycol oder Glycerol handelt. Auch die röntgendiffraktometrische Messung am Goniometer findet zumeist unter flüssigem Stickstoff statt, um die Zerstörung des Kristalls durch den Energieeintrag der Röntgenstrahlen während der Messung zu minimieren. Aus dem erfassten Diffraktionsmuster lassen sich die Amplitude und die Wellenlänge der durch den Kristall reflektierten Röntgenstrahlung bestimmen, während die zur vollständigen Charakterisierung der Wellenfunktion benötigte Phaseninformation fehlt. Zunächst muss diese Information z.B. aus einem bereits zuvor erstellen ähnlichen Modell entnommen werden. Basierend auf der Summe der Funktionen der reflektierten Wellen kann eine Elektronendichteverteilung berechnet werden, die für die Erstellung des Proteinmodells verwendet wird. Der Prozess der Ableitung eines Proteinmodells aus den gemessenen Daten verläuft iterativ, indem zunächst ein initiales Modell verfeinert wird (*refinement*). Bewertungskriterien sind dabei empirisch ermittelte Wahrscheinlichkeiten bezüglich der Konformation der Aminosäureseitenketten, der

Geometrie des Proteinrückgrats und der Bindungslängen. Das auf diese Weise erhaltene Modell wird als Grundlage für die Generierung eines neuen Modells genutzt, welches wiederum verfeinert wird, sodass sich ein Kreislauf bildet. Dieser Prozess wird wiederholt, bis das Proteinmodell die Informationen, die sich aus den Messdaten ergeben, möglichst vollständig beinhaltet.

Nach der Übertragung des aufgezeichneten Diffraktionsmusters in eine Elektronendichteverteilung ließen sich die Struktur der ATP-Bindetasche der CLK1 und die Lokalisation des gebundenen Inhibitors in dieser bei einer Auflösung von 1.45 Å eindeutig bestimmen. Lediglich für den 3-Hydroxyphenylring wurden zwei denkbare Rotamere identifiziert. In Abbildung 37 ist das Modell der Kinase mit Verbindung **17I** dargestellt, welches basierend auf der Elektronendichteverteilung generiert wurde und dasjenige Rotamere zeigt, bei dem eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zu Asp250 beobachtet wird.

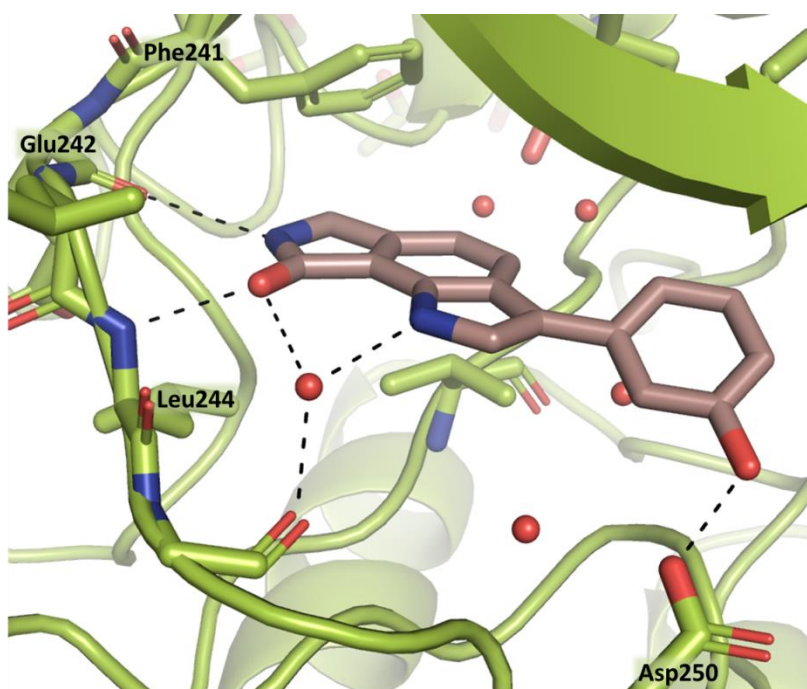


Abbildung 37: ATP-Bindetasche der CLK1 Kristallstruktur mit **17I** als co-kristallisiertem Inhibitor; *schwarze unterbrochene Linie:* Wasserstoffbrückenbindungen.

Insgesamt ist eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit dem durch das *docking* vorhergesagten Bindemodus zu erkennen. Das Lactam-Strukturelement des Liganden bildet zwei direkte Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Glu241 und Leu244 der *hinge*-Region aus. Erweitert wird diese für einen Großteil der bekannten Kinase-Inhibitoren wichtige Wechselwirkung durch eine indirekte, über ein Wassermolekül vermittelte,

Wasserstoffbrücke zu dem Carbonyl-Sauerstoffatom von Gly245 (*gk+4*). Auf der Seite des Liganden stellen zum einen das Carbonyl-Sauerstoffatom der Pyrrolidin-Struktur und zum anderen das Indol-Stickstoffatom die Bindungspartner des Wassermoleküls dar. Über den 3-Hydroxyphenyl-Substituenten wird eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu Asp250 in der α -Helix am Eingang der ATP-Bindetasche ausgebildet, die den Inhibitor zusätzlich fixiert. Der lipophile Indol-Grundkörper ist an hydrophoben Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Val324 und Val175 am Boden bzw. an der Decke der Bindetasche beteiligt. Ein Wassermolekül in unmittelbarer Nähe des Inhibitors geht keine Interaktionen mit diesem ein, ist jedoch mit der Kinase über Wasserstoffbrücken verbunden (nicht dargestellt).

Während der Raum nahe der *hinge*-Region vollständig durch den Liganden ausgefüllt wird, ist die ATP-Bindetasche im Bereich des DFG-Motivs und der α C-Helix lediglich durch Wassermoleküle besetzt (Abbildung 38).

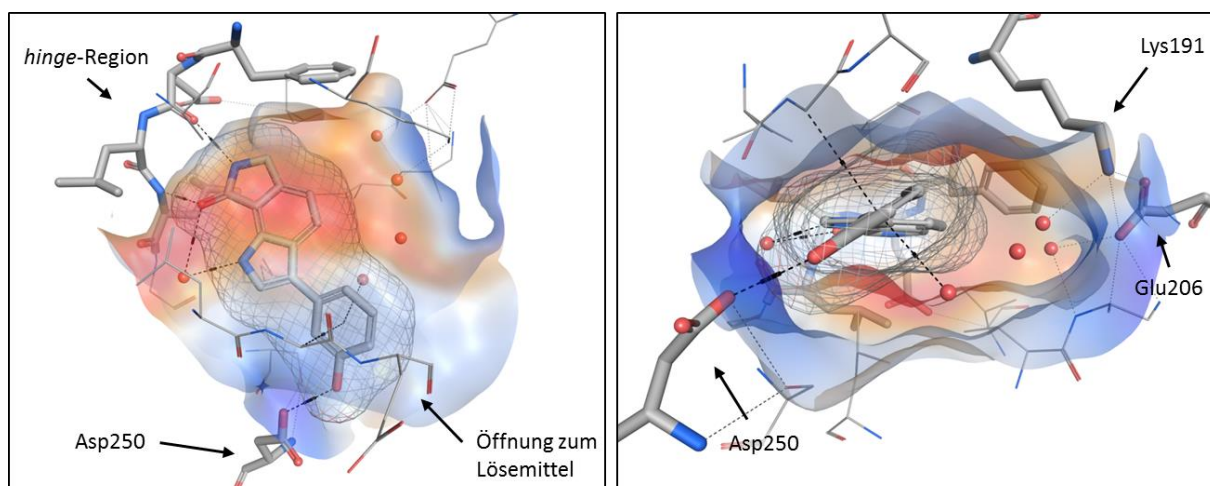


Abbildung 38: Räumliche Nutzung der ATP-Bindetasche durch den co-kristallisierten Inhibitor **171** in CLK1; *links*: Aufsicht, *rechts*: Seitenansicht; *orange*: lipophile Proteinoberfläche, *blau*: hydrophile Proteinoberfläche, *Gitternetz*: Oberfläche des Liganden, *unterbrochene schwarze Linie*: Wechselwirkungen.

In der zum Teil lipophil geprägten Region der Bindetasche bauen vier Wassermoleküle ein Netz aus Wasserstoffbrücken untereinander, sowie zu Lys191 und Glu206 aus der α C-Helix auf. Die Verdrängung dieser Wassermoleküle durch die synthetische Erweiterung des Inhibitors könnte zu einem Entropiegewinn führen und so eine Erhöhung der Aktivität bedingen.

Die alternative Rotation des 3-Hydroxyphenyl-Rests führt zur Orientierung der Hydroxyl-Funktion in Richtung der P-Schleife und des konservierten Lysins (Lys191), jedoch ohne dass

es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommt (Abbildung 39). Es scheint also, dass der Phenyl-Ring trotz der Möglichkeit zur Interaktion mit Asp250 seine Beweglichkeit in Form der Rotation um die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung zum 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundkörper beibehalten hat.

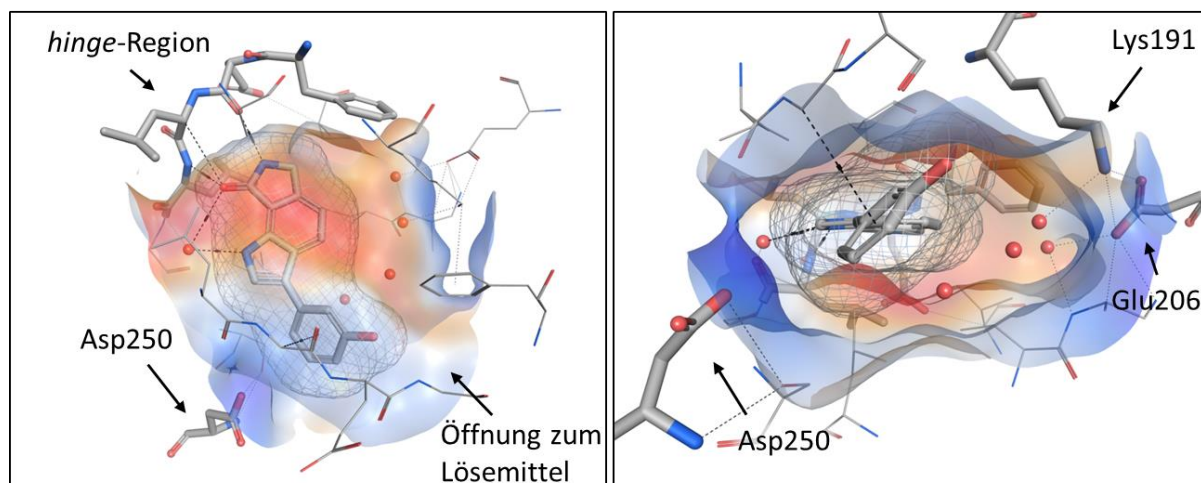


Abbildung 39: Alternative Rotation des 3-Hydroxyphenyl-Restes von **17I** in CLK1; *links*: Aufsicht, *rechts*: Seitenansicht; *orange*: lipophile Proteinoberfläche, *blau*: hydrophile Proteinoberfläche, *Gitternetz*: Oberfläche des Liganden, *unterbrochene schwarze Linie*: Wechselwirkungen.

6.2 Röntgenkristallstruktur von CLK1 mit **54**

Ebenso wie die Co-Kristallstruktur von **17I** mit CLK1 konnte der Inhibitor **54** nach dem gleichen Verfahren in der ATP-Bindetasche co-kristallisiert werden, wobei die Auflösung 1.87 Å betrug. Das erstellte Modell macht deutlich, dass der Bindemodus durch den 2-Brom-Substituenten unverändert bleibt (Abbildung 40). Es kommt wiederum zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Lactam-Struktur des Liganden und den Aminosäuren *gk*+1 und *gk*+3 der *hinge*-Region. Genauso ermöglicht ein Wassermolekül, das sich in der Nähe des Indol-Stickstoffs befindet, eine indirekte Wasserstoffbrückenbindung zu Gly245. Der unbesetzte Raum in der Umgebung des konservierten Lysins (Lys191) und des Glutamats der α C-Helix (Glu206) wird in ähnlicher Weise durch drei Wassermoleküle eingenommen. Im Gegensatz zu der Kristallstruktur, die das 3-Hydroxyphenyl-Derivat enthält, ist der Eingang der ATP-Bindetasche jedoch etwas weiter geöffnet. Die P-Schleife und das Asp250 bilden keine säulenartige Struktur aus, welche den Zugang zur Bindetasche beschränkt oder einen bereits gebundenen Ligand vom Lösemittel abschirmt. Es liegt nahe, dass diese Konformationsveränderung der flexiblen P-Schleife auf den voluminösen Brom-Substituenten zurückzuführen ist.

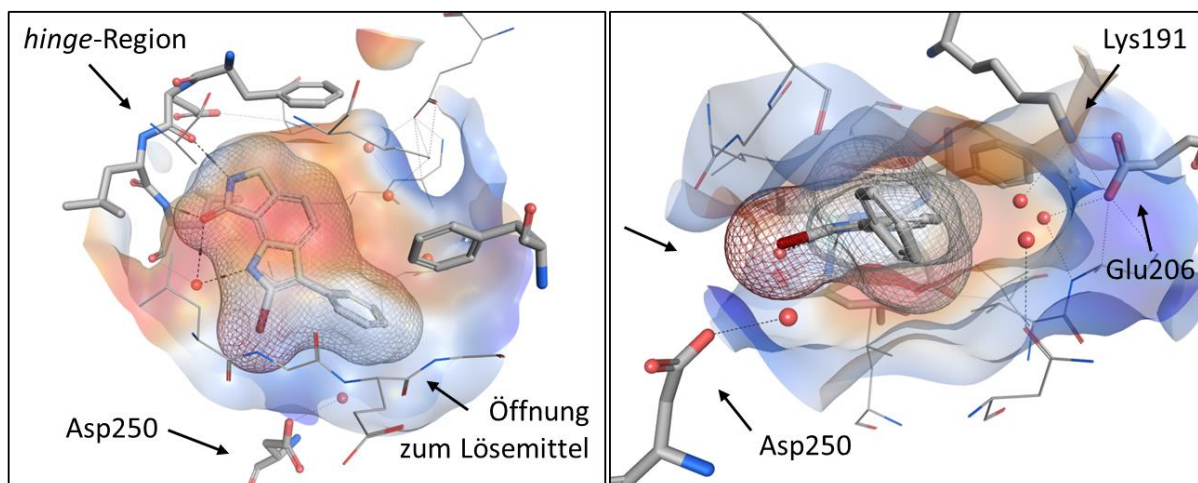


Abbildung 40: Räumliche Nutzung der ATP-Bindetasche durch den co-kristallisierten Inhibitor **54** in CLK1; *links*: Aufsicht, *rechts*: Seitenansicht; *orange*: lipophile Proteinoberfläche, *blau*: hydrophile Proteinoberfläche, *Gitternetz*: Oberfläche des Liganden, *unterbrochene schwarze Linie*: Wechselwirkungen.

Die Darstellung der Oberfläche des Liganden zeigt, dass nur durch die Vergrößerung der Öffnung ausreichend Raum für die Platzierung des Brom-Substituenten zur Verfügung gestellt werden kann. Gleichzeitig wird der Ligand dadurch stärker dem hydrophilen Medium ausgesetzt. Bei der Analyse der röntgendiffraktometrischen Daten zeigte sich, dass Verbindung **54** in der ATP-Bindetasche von CLK1 zum Teil intakt vorlag, dass jedoch ebenso Kristall-Inhibitor-Komplexe vorhanden waren, in denen der Brom-Substituent in Position 2 abgespalten war (Abbildung 41).

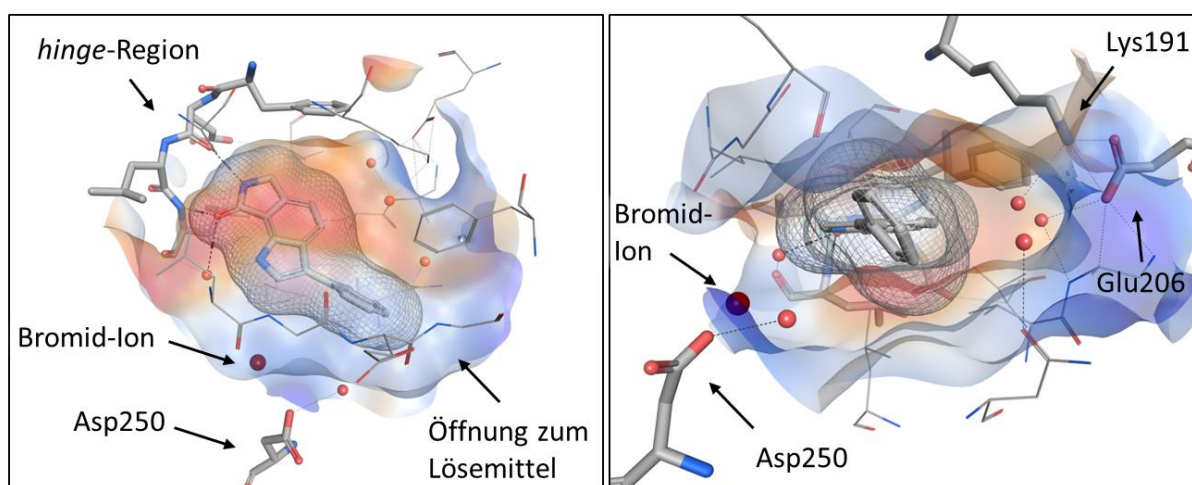


Abbildung 41: Räumliche Nutzung der ATP-Bindetasche durch den co-kristallisierten Inhibitor **54** in CLK1; Darstellung der Abspaltung des 2-Brom-Substituenten während der röntgendiffraktometrischen Analyse; *links*: Aufsicht, *rechts*: Seitenansicht; *orange*: lipophile Proteinoberfläche, *blau*: hydrophile Proteinoberfläche, *Gitternetz*: Oberfläche des Liganden, *unterbrochene schwarze Linie*: Wechselwirkungen.

Durch die Energie der Röntgenstrahlen, die während der Vermessung auf den Proteinkristall einwirkt, kann es zur Abspaltung von Halogen-Substituenten kommen. Dieses Phänomen wurde für die Co-Kristallisation von Hymenialdisin mit CLK1 beschrieben (PDB: 1Z57)⁹ und auch im vorliegenden Fall beobachtet. Abbildung 41 zeigt das an 2-Position unsubstituierte 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on gebunden in der ATP-Bindetasche. In unmittelbarer Nähe zu dem Liganden wurde ein freies Bromid-Ion lokalisiert, welches aus Verbindung **54** stammen muss, da dem Medium keine weitere Brom-haltige Komponente zugesetzt wurde.

6.3 Röntgenkristallstruktur von CLK3 mit **17a**

Für die Erstellung der Co-Kristallstruktur von CLK3 mit **17a** wurde grundsätzlich analog zu der Vorgehensweise zur Gewinnung der CLK1-Co-Kristallstrukturen verfahren. Lediglich der Aufreinigungsprozess und die Auswahl an Präzipitanten-Gemischen unterschieden sich geringfügig. Die aus dem Diffraktionsmuster berechnete Elektronendichteverteilung gestattete bei einer Auflösung von 2.02 Å auch hier die genaue Lokalisation des Liganden in der ATP-Bindetasche der Kinase. Das Lactam-Strukturelement des 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons (**17a**) bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu der *gk*+1-, sowie der *gk*+3-Aminosäure aus, bei denen es sich wie in der CLK1 um Glutamat und Leucin handelt (Abbildung 42). Des Weiteren ist die gleiche indirekte Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül zu Leu239 sichtbar. Zwei Wassermoleküle am Eingang der Bindetasche interagieren lediglich mit Asn242, nicht jedoch mit dem gebundenen Inhibitor. Eine Wechselwirkung mit Glu245, welches das Asp250 in CLK1 ersetzt, ist nicht zu beobachten, da die Aminosäureseitenkette dem Lösemittel zugewandt ist und der Ligand zudem keinen Wasserstoffbrückendonator an dem Phenyl-Rest in 3-Position trägt. Dadurch bedingt kommt es zu einer leichten Veränderung der Orientierung des Liganden, die dazu führt, dass sich das Indol-Stickstoffatom von der hinge-Region entfernt und der Phenyl-Rest sich gleichzeitig dem DFG-Motiv und der αC-Helix nähert.

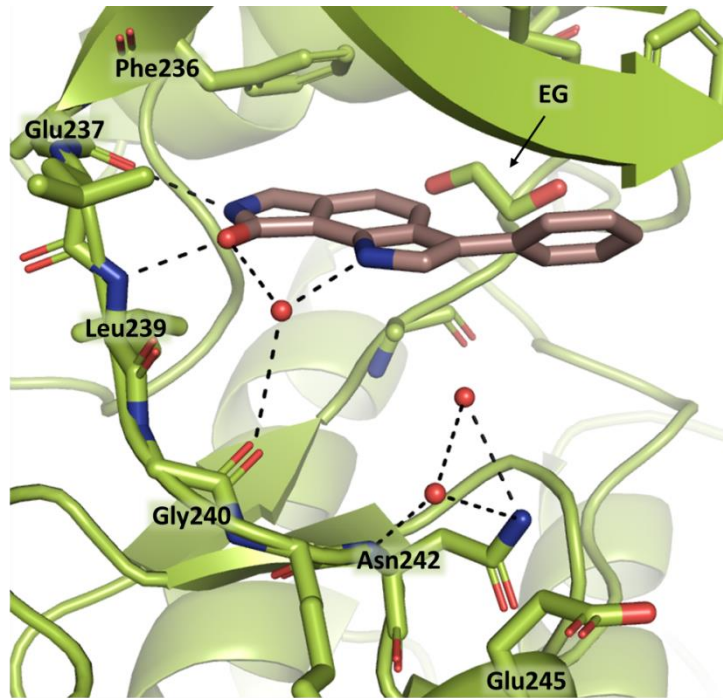


Abbildung 42: Co-Kristallstruktur von **17a** in CLK3; EG: Ethylenglycol, schwarze unterbrochene Linie: Wasserstoffbrückenbindungen.

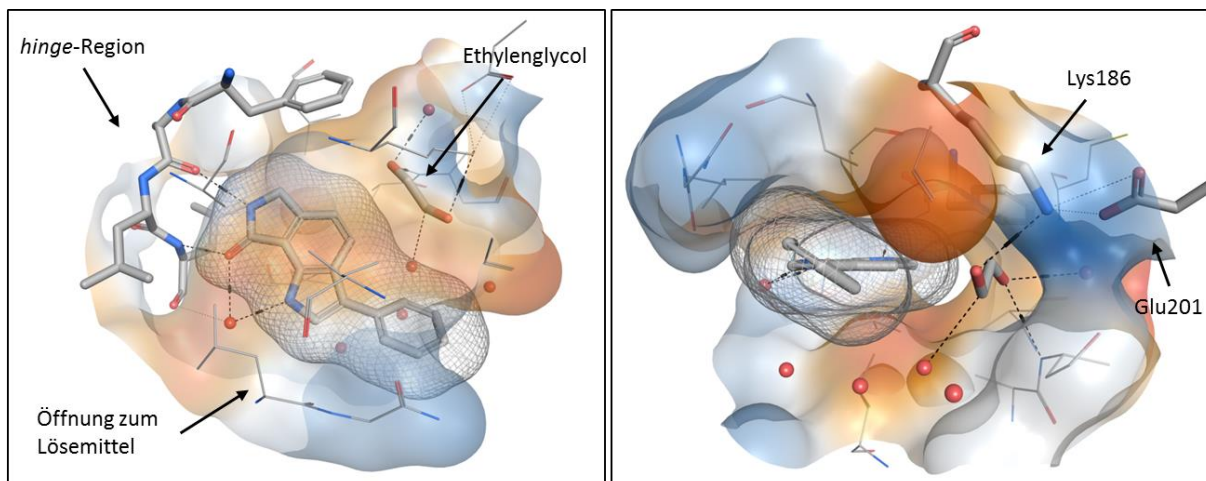


Abbildung 43: Darstellung der Ausfüllung der ATP-Bindetasche von CLK3 durch **17a** in der Co-Kristallstruktur; orange: lipophile Proteinoberfläche, blau: hydrophile Proteinoberfläche, Gitternetz: Ligandenoberfläche, schwarze unterbrochene Linie: Wechselwirkungen.

Bei Betrachtung der Oberflächen der Bindetasche und des darin gebundenen Liganden wird deutlich, dass der Raum im Bereich der α C-Helix und des DFG-Motivs nicht zur Interaktion mit der Kinase genutzt wird (Abbildung 43). In der Kristallstruktur ist dort ein Ethylenglycol-Molekül vorhanden, welches durch Wasserstoffbrücken zu dem konservierten Lysin (Lys186) und Asp320 des DFG-Motivs in der ATP-Bindetasche fixiert wird. Weiterhin zeigt die Darstellung der Oberfläche die im Vergleich zur CLK1 deutlich stärker ausgeprägte Öffnung zum Lösemittel, denn beispielsweise kommt es hier nicht zur Ausbildung einer Säule

zwischen Glu245 und der P-Schleife. Dadurch ist der lipophile Phenyl-Rest des Liganden in größerem Maße dem wässrigen Milieu außerhalb der Bindetasche ausgesetzt. Bei dem Vergleich des Bindemodus in der Kristallstruktur mit der getroffenen Vorhersage durch molekulares *docking* (Kapitel 3.1, Abbildung 21), zeigte sich eine weitestgehende Übereinstimmung.

Insgesamt konnten durch alle drei Kristallstrukturen die vorhergesagten Bindemodi bestätigt werden, die damit einen Beweis für die Aussagekraft des molekularen *dockings* und die Nützlichkeit der Verwendung dieser Methode für die Entwicklung neuer Inhibitoren lieferten.

7 Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die nach den in Kapitel 4 beschriebenen Methoden dargestellten Verbindungen der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one (**17**) und der 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide (**19**) wurden auf ihre inhibitorische Aktivität an einer Reihe von verwandten Kinasen der CMGC-Gruppe evaluiert. Dafür wurden mit Hilfe von *in vitro* Assays mittels radioaktiv markiertem ATP die IC₅₀-Werte der Substanzen experimentell bestimmt. Eine Analyse der gewonnenen Daten in Abhängigkeit von der Veränderung der Molekülstruktur lässt die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen zu.

7.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one

Für die Verbindungsklasse 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one (**17**, Abbildung 44) wurden in den meisten Fällen niedrig nanomolare IC₅₀-Werte für die Aktivität an CLK1 ermittelt, wodurch eine potente inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden konnte. Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Derivaten lassen sich durch strukturelle Veränderungen und deren Auswirkungen auf den Bindemodus erklären.

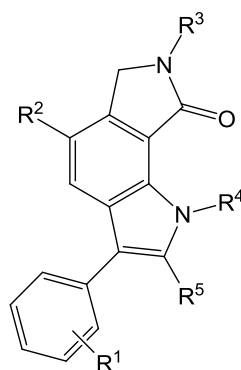


Abbildung 44: Grundkörper der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17** und Positionen, an denen Derivatisierungen vorgenommen wurden.

An Hand der *docking*-Studien fiel auf, dass der Phenyl-Rest in 3-Position des 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Grundkörpers immer in Richtung Medium orientiert war und somit wenig direkte Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der ATP-Bindetasche einging. Dementsprechend war von einem geringen Einfluss des Substitutionsmusters (R¹) auf die Aktivität der Verbindungen auszugehen, was sich in den Enzymtests an CLK1 bestätigte (Tabelle 9). Unabhängig davon, ob der Phenyl-Rest einen elektronenziehenden

Chlor-Substituenten oder eine elektronenschiebende Methoxy-Gruppe trägt, bleibt die Aktivität im unteren nanomolaren Bereich erhalten.

Tabelle 9: IC₅₀-Werte [μM] für CLK1, DYRK1A und DYRK2 von ausgewählten Derivaten von **17a**, die sich in ihrer Substitution am 3-Phenyl-Rest (R¹) unterscheiden.

	R ¹	CLK1	DYRK1A	DYRK2
17k	2-Cl	0.140	1.1	nd ^a
17c	3-Cl	0.088	> 10	> 10
17d	4-Cl	0.100	> 10	9.3
17i	3-OCH ₃	0.110	3.8	2.1
17l	3-OH	0.044	0.740	0.590

^a nd: nicht bestimmt.

Jedoch veränderte sich die Selektivität der Substanzen in Abhängigkeit der Substituenten. Sowohl bei Chlor-Substituenten in *ortho*- oder *para*-Position als auch bei einer *meta*-Methoxy-Gruppe oder Hydroxyl-Funktion wurde neben der Aktivität an den CLK-Kinasen auch eine Inhibition von Kinasen der DYRK-Familie beobachtet. Insbesondere Verbindung **17l** zeigte sich dabei als vergleichsweise unselektiv und hemmte DYRK1A und DYRK2 mit submikromolaren IC₅₀-Werten. Diese Promiskuität des Phenols lässt sich durch das zusätzliche Interaktionspotential, welches die Hydroxyl-Funktion bietet, erklären. Die in Abbildung 45 gezeigte *docking*-Pose von **17l** in DYRK1A verdeutlicht die Ähnlichkeit des Bindemodus zu der Orientierung in CLK1 (Kapitel 3.1, Abbildung 14A). Lediglich der Bindungspartner der Hydroxyl-Funktion unterscheidet sich, da das Aspartat am Eingang der Bindetasche (Asp247) zu weit von dem Liganden entfernt ist, als dass es zu einer mit CLK1 vergleichbaren Interaktion kommen könnte. Stattdessen wird eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Rückgrat von Lys167 in der P-Schleife ausgebildet.

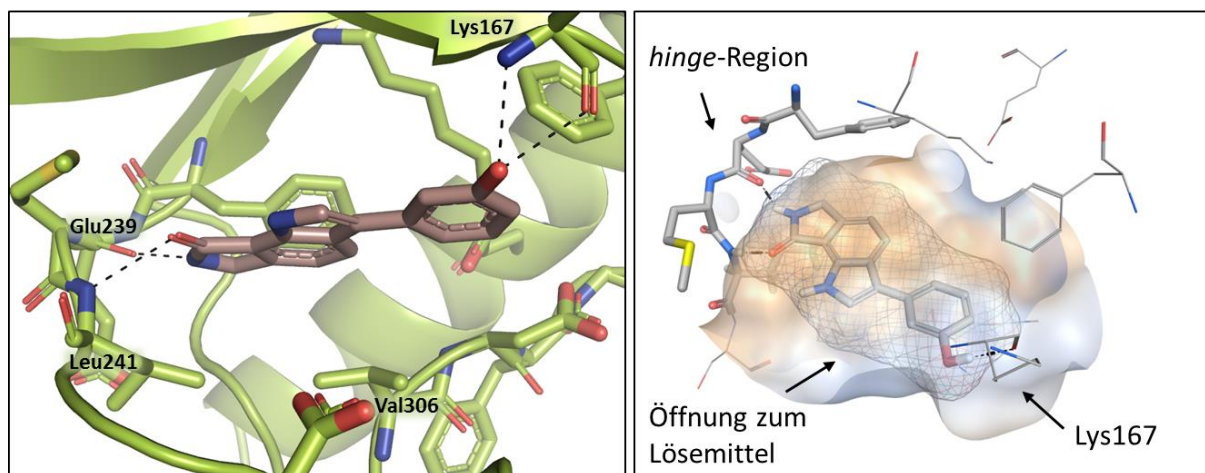


Abbildung 45: Docking von 3-Hydroxyphenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on **17I** in DYRK1A (PDB: 3ANQ); links: Darstellung des Bindemodus von **17I**, rechts: Darstellung der Ausfüllung der ATP-Bindetasche an Hand der Oberflächen; schwarze unterbrochene Linie: Wasserstoffbrückenbindungen, orange: lipophile Proteinoberfläche, blau: hydrophile Proteinoberfläche, Gitternetz: Ligandenoberfläche.

Im Gegensatz zu dem Phenol-Derivat stellte sich Verbindung **17c**, welche ein Chloratom an Position 3 des Phenyl-Rests trägt, als vollständig selektiv für die CLK-Familie (CLK1, CLK2, CLK4) heraus. Mit Hilfe des Vergleichs der *docking*-Posen in CLK1 und DYRK1A (Kapitel 3.1, Abbildung 23) lässt sich diese Beobachtung jedoch nur andeutungsweise erklären. Auf Grund der weiter geöffneten ATP-Bindetasche von DYRK1A ist der lipophile Chlor-Substituent im Vergleich zu der Situation in CLK1 stärker dem hydrophilen Umgebungsmedium ausgesetzt, wodurch negative Effekte auf die Aktivität erklärbar sein könnten (Abbildung 46).

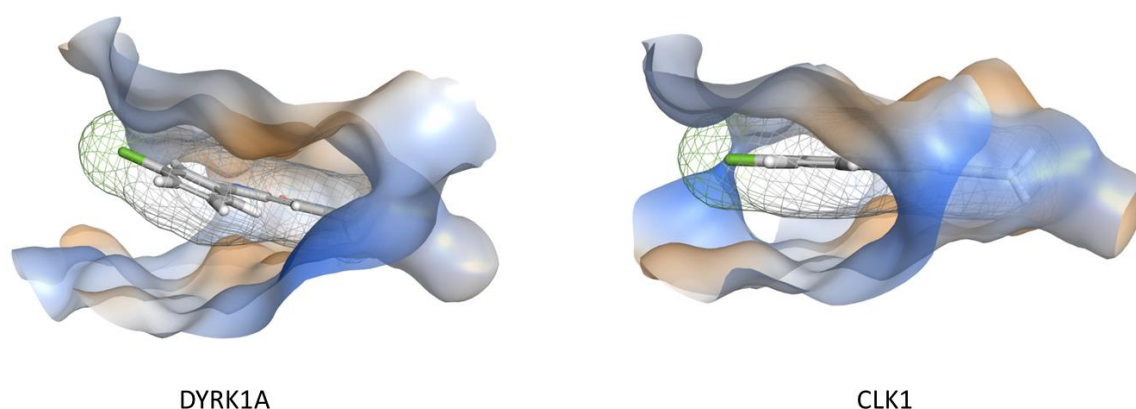


Abbildung 46: Docking-Pose von Verbindung **17c** in DYRK1A (links) und CLK1 (rechts). Verdeutlichung der stärkeren Lösemittel-Exposition des Liganden in DYRK1A; orange: lipophile Proteinoberfläche, blau: hydrophile Proteinoberfläche, Gitternetz: Ligandenoberfläche.

Im Fall eines *ortho*- oder *para*-Chlor-Substituenten ist das lipophile Halogen trotz größerer Öffnung der Bindetasche dem Medium dennoch in geringerem Maße exponiert (Abbildung

47). Insbesondere spiegelt sich dies in der gesteigerten Aktivität von **17k** an DYRK1A wider, bei der der *ortho*-Chlor-Substituent am stärksten geschützt ist.

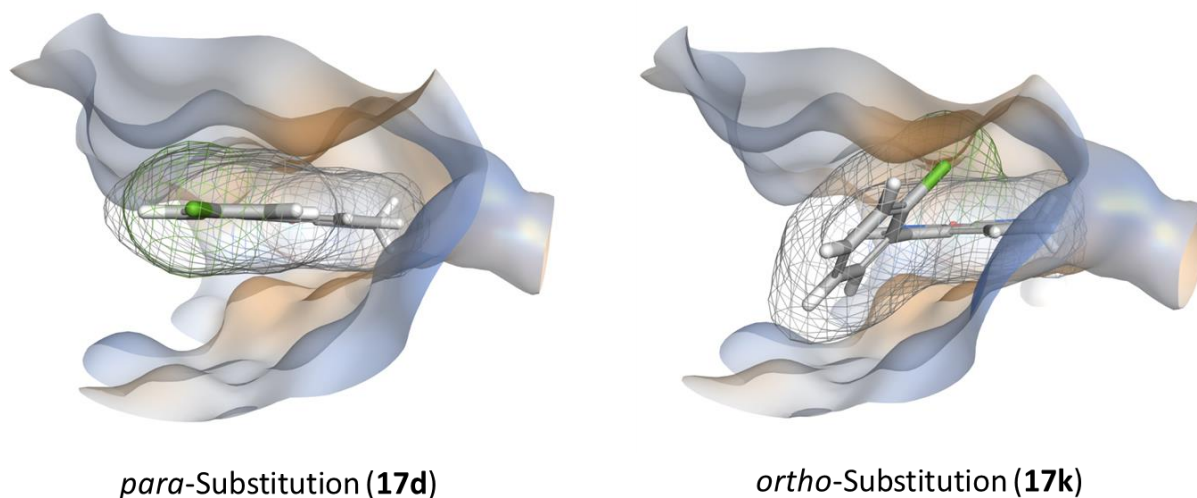
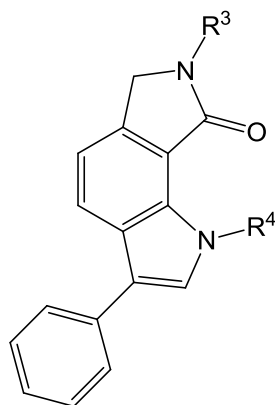


Abbildung 47: Docking-Posen von Verbindung **17d** (links) und **17k** (rechts) in DYRK1A. Verdeutlichung der Exposition gegenüber dem Medium; orange: lipophile Proteinoberfläche, blau: hydrophile Proteinoberfläche, Gitternetz: Ligandenoberfläche.

Basierend auf dem durch molekulares *docking* vorhergesagten Bindemodus von Verbindung **17a** wurden unterschiedliche Effekte nach der selektiven Alkylierung der Positionen *N1* beziehungsweise *N7* erwartet. Die ermittelten IC₅₀-Werte für die Derivate dieser Serie konnten diese Annahme bestätigen (Tabelle 10). So war die an dem Lactam-Stickstoffatom methylierte Verbindung **17h** an allen getesteten Kinasen inaktiv, wodurch der essentielle Charakter der Wasserstoffbrückenbindung über dieses Strukturelement zur *hinge*-Region bewiesen werden konnte.

Tabelle 10: IC₅₀-Werte [μM] für CLK1, DYRK1A und DYRK2 von N1- und N7-substituierten Derivaten der Ausgangsverbindung **17a**.**17h, 22a-e**

	R ³	R ⁴	CLK1	DYRK1A	DYRK2
17h	CH ₃	H	> 10	> 10	> 10
22a	H	CH ₃	0.190	> 10	> 10
22b	H	C ₂ H ₅	0.380	3.9	nd ^a
22c	H	CH ₂ COOC ₂ H ₅	> 10	> 10	nd ^a
22d	H	CH ₂ CONH ₂	> 10	> 10	> 10
22e	CH ₃	CH ₃	> 10	> 10	> 10

^a nd: nicht bestimmt.

Lag lediglich eine Methylierung des Indol-Stickstoffatoms (**22a**) vor, wurde nur ein schwacher Verlust der inhibitorischen Wirkung an CLK1 beobachtet, während die Verbindung an den Kinasen der DYRK-Familie weiterhin inaktiv blieb. Erst die zweifache Methylierung führte wiederum zur vollständigen Inaktivität der Substanz (**22e**). Da die ATP-Bindetasche auch für größere Alkyl-Reste an Position 1 (R⁴) des Grundkörpers Raum bietet, wurden die N1-Ethyl-, N1-Ethylelessigsäureester- und N1-Acetamid-Verbindungen synthetisiert und biologisch evaluiert. An den Ergebnissen ist erkennbar, dass die Aktivität mit Zunahme der Größe des Restes abnimmt und bereits im Fall des Acetamid-Derivates **22d** keine Hemmung an der CLK1 detektiert wurde. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der vorhergesagten *docking*-Pose, die durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen eine Erhöhung der Aktivität vermuten ließ (Abbildung 48, links).

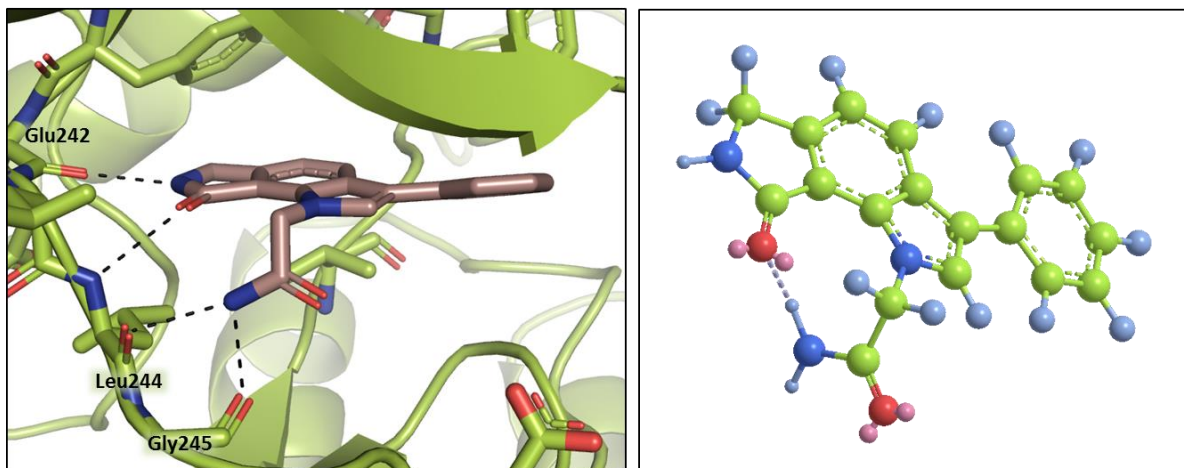


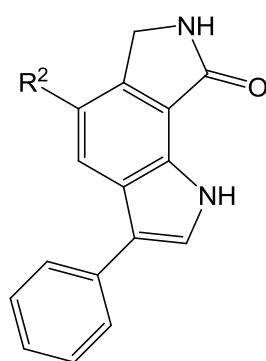
Abbildung 48: links: docking-Pose von **22d** in CLK1 mit zusätzlicher Wasserstoffbrücke zur *hinge*-Region über das Amid-Strukturelement; rechts: Aus der Moleküldynamik-Simulation resultierende Konformation mit intramolekularer Wasserstoffbrückenbindung (durchgeführt mit Chem3D).

Eine Moleküldynamik-Analyse lieferte einen Erklärungsansatz für die gefundene Inaktivität. Die Simulation mit Chem3D unter Verwendung des MM2 Kraftfelds entwickelt von ALLINGER *et al.*¹¹¹ führte zu einer Konformation, in der sich eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton am Stickstoffatom der primären Amid-Funktion und dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Lactam-Struktur ausgebildet hat (Abbildung 48, rechts). Dadurch wird zum einen die Interaktion des primären Amids mit der *hinge*-Region verhindert und zum anderen wird das Sauerstoffatom der Lactam-Funktion in seiner Wechselwirkung mit Leu244 eingeschränkt. Insgesamt hat dies den Verlust der inhibitorischen Aktivität zur Folge.

Des Weiteren wurden 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on-Derivate mit Substituenten in 5-Position (R^2) auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, wurde die ATP-Bindetasche von CLK1 durch die Grundstruktur **17a** insbesondere im Bereich der α C-Helix nicht vollständig ausgefüllt. Die in 5-Position eingeführten Substituenten sollten den *docking*-Ergebnissen nach nun diesen Raum besetzen (Abbildung 49). Dennoch wiesen die synthetisierten Derivate **21a-21e** keine verbesserte Inhibition an den Kinasen der CLK-Familie auf. Im Fall des 5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons **21a** blieb der IC_{50} -Wert für CLK1 praktisch unverändert, jedoch kam es zu einem deutlichen Verlust an Selektivität gegenüber DYRK1A (IC_{50} -Wert: 200 nM). Ebenso wurden CDK1, CDK5 und CK1 mit IC_{50} -Werten unter 10 μ M gehemmt. Die Phenyl-substituierten Derivate (**21c-21e**) behielten hingegen ihre Selektivität

bei, allerdings wiesen alle Vertreter lediglich einstellig mikromolare Inhibitionswerte für CLK1 auf. Es ist anzunehmen, dass sich der lipophile Charakter der Phenyl-Reste in der Nähe des hydrophilen konservierten Lysins und des Glutamats der α C-Helix ungünstig auf die Aktivität sowohl an Vertretern der DYRK-Familie als auch bei CLK-Kinasen auswirkt. Zusätzlich lässt der erhöhte Platzbedarf der voluminösen Reste einen negativen Effekt vermuten, da eine Veränderung der Position des Inhibitors in der ATP-Bindetasche nötig ist. Dies hat zur Folge, dass der Phenyl-Rest in Position 3 stärker aus der Bindetasche in das hydrophile Medium ragt, als es beispielsweise bei der 5-Brom-Substitution der Fall war. Im Vergleich von Abbildung 49C und D wird diese Änderung besonders deutlich sichtbar. Der 3-Phenyl-Rest steht bei der Bindung an DYRK1A deutlich mit dem Umgebungsmedium in Kontakt.

Tabelle 11: IC₅₀-Werte [μ M] für CLK1, DYRK1A und DYRK2 von in 5-Position substituierten Derivaten der Ausgangsverbindung **17a**.



21a-e

	R²	CLK1	DYRK1A	DYRK2
21a	Br	0.043	0.2	nd ^a
21b	Cl	0.38	1.9	> 10
21c	Phe	8.8	> 10	> 10
21d	2-F-Phe	5.8	> 10	> 10
21e	3-F-Phe	7.2	> 10	> 10

^a nd: nicht bestimmt.

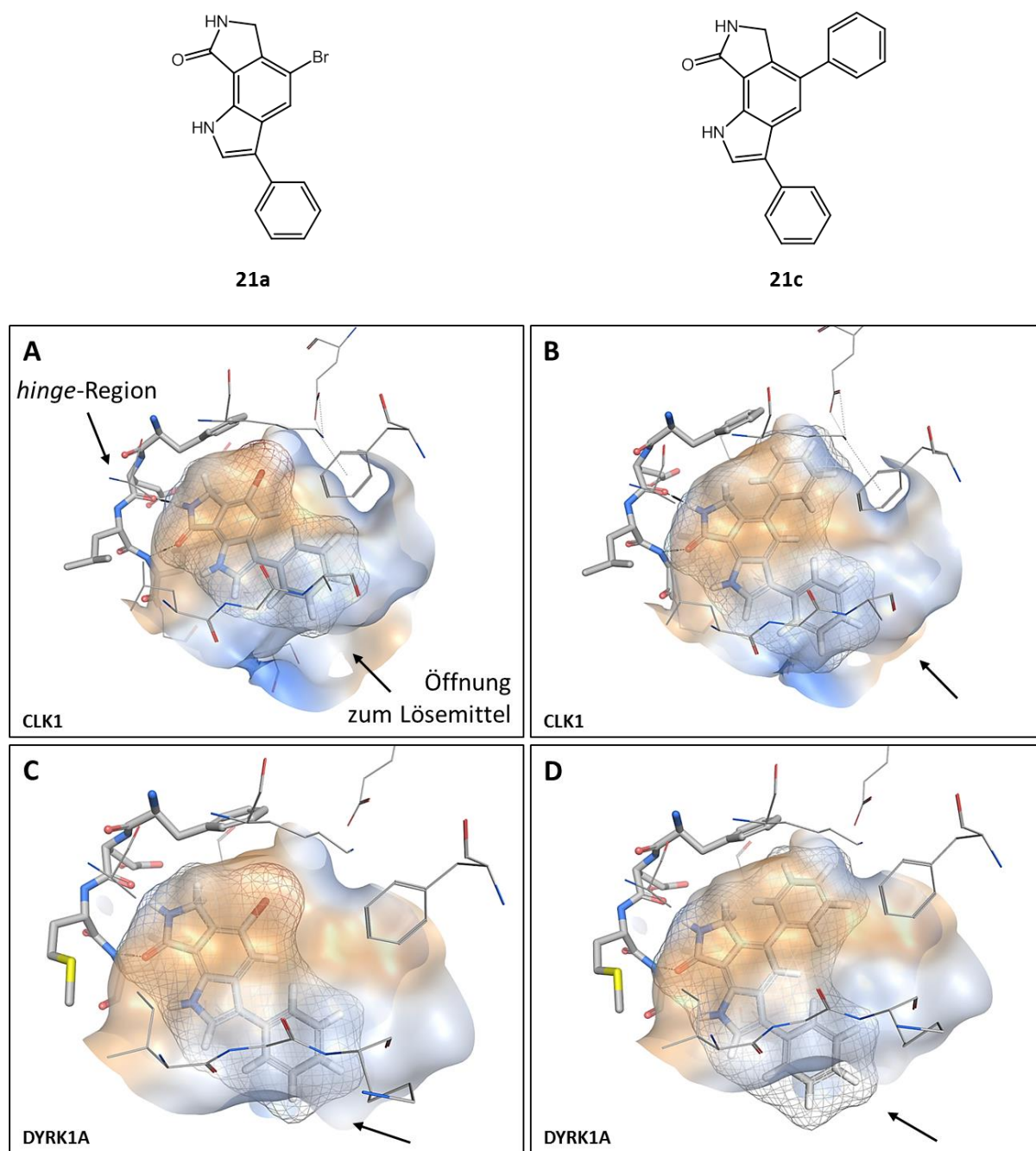
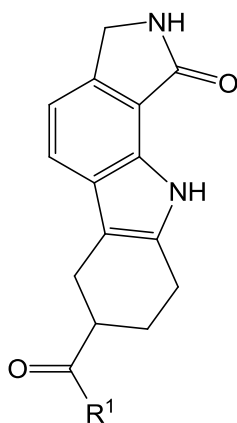


Abbildung 49: Docking-Posen von **21a** und **21c** zur Darstellung der Ausfüllung der ATP-Bindetasche von CLK1 und DYRK1A; **A:** CLK1 mit Verbindung **21a**, **B:** CLK1 mit **21c**, **C:** DYRK1A mit **21a** und **D:** mit **21c**; orange: lipophile Proteinoberfläche, blau: hydrophile Proteinoberfläche, Gitternetz: Ligandenoberfläche.

In Verbindung **50a** wurde der 5-Brom-Substituent mit der Einführung einer Methylgruppe in Position 2 (R^5) kombiniert. Dies hatte zur Folge, dass die Selektivität gegenüber den CDK-Kinasen und CK1 zurückgewonnen wurde, wobei sich die Aktivität an den Kinasen der DYRK-Familie jedoch weiter erhöhte.

Struktur-Wirkungsbeziehung der Verbindungen 60 und 61

Um die Struktur-Wirkungsbeziehungen zusätzlich zu erweitern wurde der Phenyl-Rest in Position 3 durch einen anellierten Cyclohexencarboxylat-Ring (**60**) ersetzt und im Anschluss dessen Methylamid **61** dargestellt.



60: $R^1 = OH$

61: $R^1 = NHCH_3$

Abbildung 50: Grundkörper des 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ons mit anelliertem Carboxylcyclohexen-Strukturelement.

Auf Grund der *docking*-Studien war zu vermuten, dass diese Verbindungsklasse trotz des anellierten Carboxylcyclohexen-Strukturelements eine zu **17a** vergleichbare Orientierung in der Bindetasche von CLK1 einnehmen würde (Abbildung 51). Damit wären bei der Carbonsäure **60** die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur *hinge*-Region (Glu241, Leu244), sowie die Interaktion der Carboxylat-Funktion mit Glu169 möglich. Allerdings zeigte die Substanz in den Enzym-Assays keine Hemmung der getesteten Kinasen.

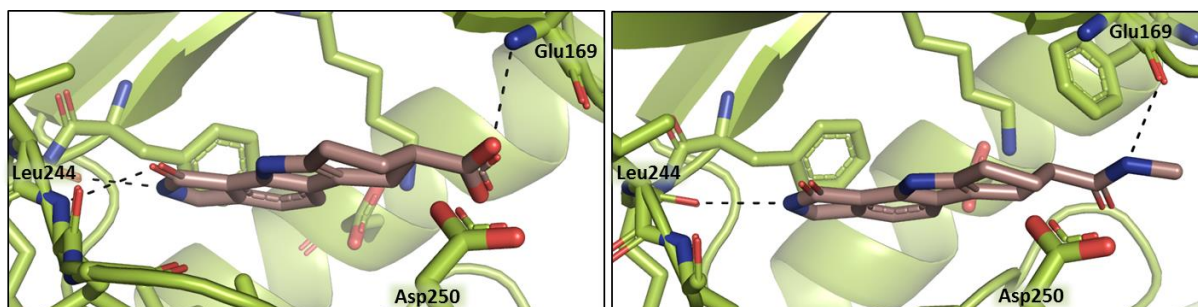


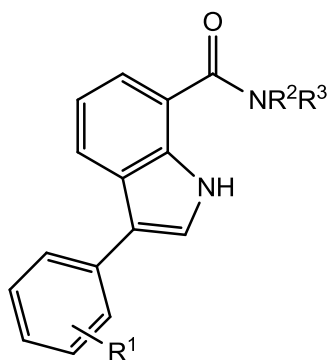
Abbildung 51: *Docking*-Ergebnisse für die Verbindungen **60** (*links*) und **61** (*rechts*) in CLK1.

Das verwandte Carbonsäuremethylamid **61** ist ähnlich in der ATP-Bindetasche positioniert, jedoch etwas stärker in Richtung der α C-Helix verschoben, wodurch lediglich die Wasserstoffbrückenbindung zu Glu241 der *hinge*-Region erhalten bleibt. Zusätzlich kommt es zu

einer Wechselwirkung zwischen dem Proton der Amid-Funktion und dem Carbonylsauerstoffatom des Protein-Rückgrats von Glu169 aus der P-Schleife. Obwohl im Vergleich zu **60** die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen um eine reduziert ist, konnte eine submikromolare Aktivität an der CLK1 nachgewiesen werden (IC_{50} -Wert: $0.8 \mu M$), die sich an Hand der *docking*-Ergebnisse nicht eindeutig begründen lässt. Um ein eindeutigeres Bild bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erhalten, wäre die Darstellung und biologische Evaluation zusätzlicher Derivate erforderlich.

7.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide

In enzymatischen Assays stellten sich die 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide **19** (Abbildung 52) im Vergleich zu den 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen **17** als insgesamt schwächer aktiv heraus.



19a-f, 19p, 58a-b

Abbildung 52: Strukturmodifikationen des 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamid-Grundkörpers.

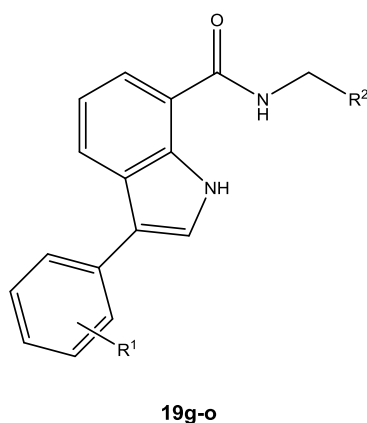
Der Großteil der strukturell sehr unterschiedlich substituierten sekundären und primären Alkylamide wies unterhalb einer Konzentration von $10 \mu M$ keine inhibitorische Aktivität an den betrachteten Kinasen auf (Tabelle 12).

Tabelle 12: IC₅₀-Werte [μM] verschieden substituierter Alkylamide für CLK1, DYRK1A und GSK3α/β.

	R ¹	R ²	R ³	CLK1	DYRK1A	GSK3α/β
19a	H	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -		> 10	> 10	> 10
19b	3-OCH ₃	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -		> 10	> 10	> 10
19c	3-Cl	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -		> 10	> 10	> 10
19e	3-OCH ₃	H	CH ₃	> 10	> 10	> 10
19f	3-OH	H	CH ₃	2.1	3.8	2.4
19p	3-OCH ₃	CH ₃	4-CH ₃ -Phe	> 10	> 10	> 10
58b	H	H	C ₂ H ₄ NH ₃ ⁺ Cl ⁻	> 10	> 10	> 10

Bei identischem 3-Methoxyphenyl-Rest waren sowohl das raumerfüllende Morpholinamid **19b** als auch das kleinere Methylamid **19e** inaktiv. Eine Variation des Substitutionsmusters am 3-Phenyl-Rest führte in Kombination mit dem Morpholinamid-Strukturelement nicht zum Erfolg (**19a**, **19c**). Dagegen zeigte Verbindung **19f**, in der eine Methylamid-Funktion mit einer Hydroxyl-Gruppe in 3-Position des Phenyl-Rests kombiniert wurde, eine hemmende Wirkung an CLK1 in niedrig mikromolarer Konzentration. Nachteilig fällt dabei jedoch die mangelnde Selektivität der Substanz auf, denn DYRK1A und GSK3α/β werden in gleicher Stärke inhibiert.

Unter den Verbindungen, die ein *N*-(Arylmethyl)-Strukturelement enthielten, konnten weitere aktive Verbindungen identifiziert werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: IC₅₀-Werte [μM] der *N*-(Arylmethyl)amide **19g-o** für CLK1, DYRK1A und GSK3α/β.


	R ¹	R ²	CLK1	DYRK1A	GSK3α/β
19g	H	Phe	> 10	> 10	> 10
19h	3-OCH ₃	Phe	0.74	2.8	> 10
19i	3-OH	Phe	> 10	> 10	> 10
19j	3-Cl	Phe	> 10	> 10	> 10
19k	H	3-Pyridyl	> 10	> 10	> 10
19l	3-OCH ₃	4-Pyridyl	> 10	> 10	0.32
19m	3-OCH ₃	3-Pyridyl	> 10	> 10	> 10
19n	3-OCH ₃	2-Pyridyl	> 10	> 10	2.4
19o	3-OCH ₃	2-F-Phe	> 10	> 10	> 10

Das *N*-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid **19h** zeigte submikromolare Aktivität an CLK1, während der für DYRK1A bestimmte IC₅₀-Wert nahezu vierfach höher ausfiel. Der Austausch des 3-Methoxy-Substituenten (R¹) gegen eine Hydroxyl-Funktion (**19i**) oder einen Chlor-Substituenten (**19j**) resultierte in erneuter Inaktivität der Verbindungen. Obwohl die Hemmwirkung von **19h** ebenso wie die Selektivität gegenüber verwandten Kinasen im Vergleich zu **19f** verbessert ist, weisen Vertreter der 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one **17** weiterhin deutlich stärkere inhibitorische Aktivität auf.

Der Austausch des Phenyl-Restes in **19h** gegen einen stickstoffhaltigen Pyridyl-Substituenten führte zu einem Verlust der Inhibition von CLK1. Im Fall des 4-Pyridyl-Derivats **19l** und des 2-

Pyridyl-Derivats **19n** konnte gleichzeitig aber eine selektive Hemmung der GSK3 α/β beobachtet werden, die zuvor nicht vorhanden war. Eine durch *docking* vorhergesagte zusätzliche Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu CLK1 über das Pyridin-Stickstoffatom konnte demnach nicht bestätigt werden, da als Konsequenz eine Steigerung der Aktivität zu erwarten gewesen wäre.

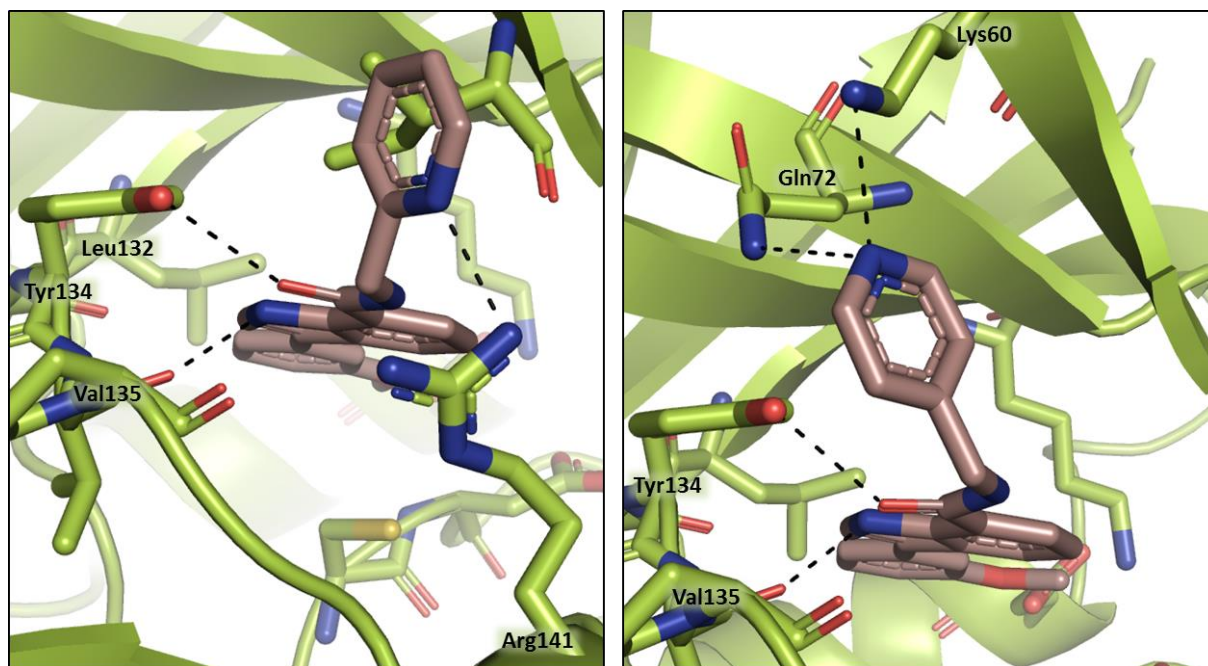


Abbildung 53: Retrospektive *docking*-Studie in GSK3 β (PDB: 1Q41); links: 2-Pyridyl-Derivat **19n**, rechts: 4-Pyridyl-Derivat **19l**; schwarze, unterbrochene Linie: Wasserstoffbrückenbindungen.

Anhand der retrospektiv durchgeführten *docking*-Studie an GSK3 β lässt sich jedoch die dort beobachtete inhibitorische Wirkung von **19l** und **19n** erklären (Abbildung 53). Für die *docking*-Versuche wurde eine Co-Kristallstruktur der Kinase mit Indirubin-3'-monoxim ausgewählt (PDB: 1Q41), da die 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide ebenfalls Indol-haltig sind und strukturell ursprünglich von Indirubin abgeleitet wurden.¹¹² Der Indol-Grundkörper ist im Zentrum der ATP-Bindetasche positioniert, wobei das Stickstoffatom in Richtung der *hinge*-Region weist, sodass eine Wasserstoffbrücke zu dem Carbonylsauerstoffatom von Val135 (*gk*+3) ausgebildet werden kann. Ebenso ist das Sauerstoffatom der Amid-Struktur zur *hinge*-Region orientiert, wodurch die Interaktion mit der Hydroxyl-Funktion der Seitenkette von Tyr134 ermöglicht wird. Zusätzlich kann der Inhibitor durch Wechselwirkungen über das Pyridin-Stickstoffatom fixiert werden. Befindet sich das Stickstoffatom an Position 2 des Pyridyl-Rests, so kommt es zu der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Arg141 am Eingang der ATP-Bindetasche. Im Fall des *para*-Pyridyl-Substituenten ist hingegen eine zweifache Interaktion des Stickstoffatoms mit den

Amino-Funktionen der Seitenketten von Gln72, sowie von Lys60 aus der P-Schleife der GSK3 β möglich. Dadurch ist der Pyridin-Ring in **19l** stärker fixiert und eher zum Inneren der ATP-Bindetasche als zum Medium ausgerichtet, was die größere Aktivität im Vergleich zu **19n** erklären könnte.

7.3 Differentielle Scanning Fluorimetrie

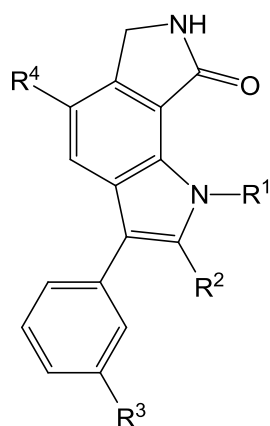
Das Verfahren der differentiellen Scanning Fluorimetrie dient der schnellen Bewertung der Affinität von potentiellen Inhibitoren zu ihren entsprechenden Target-Proteinen. Dabei wird die Temperatur gemessen, bei der ein Protein aus seiner gefalteten Raumstruktur in einen amorphen Zustand übergeht. Durch Bindung eines Inhibitors wird die native Faltung des Proteins stabilisiert, sodass die gemessene Temperatur ansteigt, weshalb diese Methode auch als *thermal shift assay* bekannt ist. Zwischen der Stärke der Bindung des Inhibitors an das Protein und der Veränderung der Schmelztemperatur besteht eine direkte Korrelation.¹¹³ Aus diesem Grund bietet der Assay eine indirekte Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität eines Liganden. Als Schmelztemperatur wird die Temperatur (T_m) erfasst, bei der die Konzentrationen von gefaltetem und ungefaltetem Protein identisch sind. Zur Ermittlung dieser Temperatur wird dem Protein-Ligand-Gemisch ein fluoreszierender Farbstoff (z.B. Sypro Orange) zugesetzt, welcher ausschließlich an die denaturierte Form des Proteins bindet und nur in der gebundenen Form bei der spezifizierten Wellenlänge fluoresziert. Durch die gleichzeitige Messung der Schmelztemperatur des reinen Proteins und der Schmelztemperatur der Protein-Inhibitor-Mischung kann die Differenz (Verschiebung) zwischen beiden ermittelt werden.

Die Bestimmung des T_m -shifts eignet sich insbesondere als Methode für ein schnelles Screening von potentiellen Inhibitoren an einer größeren Anzahl von Zielproteinen, beispielsweise zur Erstellung eines Selektivitätsprofils.

DSF-Analyse der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-one

Neben den CLKs und DYRKs spielen, wie anfangs beschrieben, unter anderem auch die SRPK-Kinasen eine wichtige Rolle bei der Regulation der zellulären *splicing*-Prozesse. Folglich sollten als CLK-Inhibitoren identifizierte Verbindungen auch auf ihre Selektivität gegenüber diesen Kinasen untersucht werden. Auf diesem Weg kann sichergestellt werden, dass beobachtete biologische Effekte tatsächlich auf der Hemmung der CLK-Aktivität beruhen. Die DSF-Analyse stellt eine einfache Methode dar, die sich für eine grobe Beurteilung der

Affinität der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one zu den SRPK-Kinasen ergründet.



- 17l** $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = OH, R^4 = H$
54 $R^1 = H, R^2 = CH_3, R^3 = H, R^4 = Br$
22d $R^1 = CH_2CONH_2, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H$

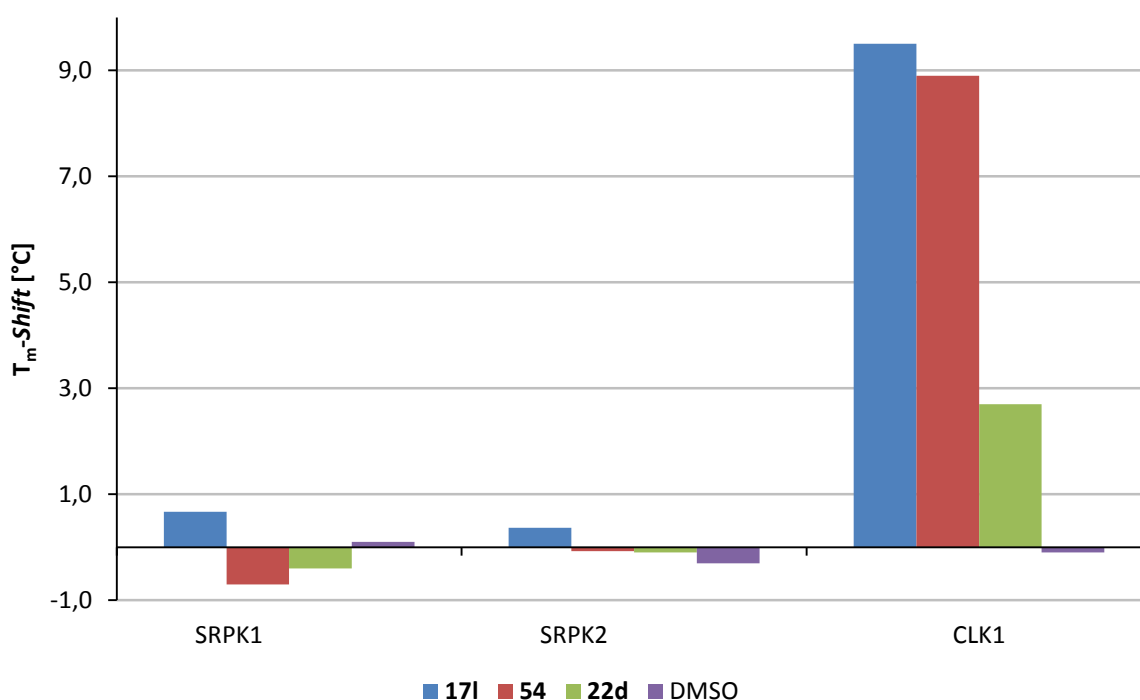


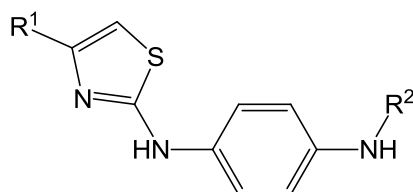
Abbildung 54: Verschiebung der Schmelztemperatur (T_m -shift, [°C]) von SRPK1, SRPK2 und CLK1 unter Zusatz der Verbindungen **17l**, **54** und **22d**. SRPK1+2: Konzentration = 100 μ M, dreifach-Bestimmung; CLK1: Konzentration = 10 μ M, einfach-Bestimmung.

In Abbildung 54 sind die Ergebnisse der Untersuchung an drei ausgewählten Vertretern der Substanzklasse gezeigt. Keine der Verbindungen führte zu einer deutlichen Erhöhung der Schmelztemperatur einer der SRPKs, was auf eine geringe Affinität zu diesen schließen lässt. Alle gemessenen Werte bewegen sich im Bereich der Negativprobe, welche mit DMSO

durchgeführt wurde. Demnach übt selbst das gegenüber anderen CMGC-Kinasen als unselektiv aufgefallene Phenol **17l** hier keine hemmende Wirkung aus. Eine gleichzeitig durchgeführte Positivkontrolle an CLK1 zeigte die auf Grund des IC_{50} -Werts erwartete Erhöhung der Schmelztemperatur für **17l** (T_m -shift = 9.5 °C). Auf diese Weise konnte die Korrelation der Schmelztemperaturveränderung mit der biologischen Aktivität für die betrachteten Kinasen und damit die Relevanz der Ergebnisse bestätigt werden.

DSF-Analyse der Screening-Hits **20**

Um das Selektivitätsprofil der aus dem Screening resultierten Substanzklasse der *N*-(4-Aminophenyl)acetamide **20** ebenso zu erweitern, wurde für alle Vertreter deren Affinität zu SRPK1 und SRPK2 durch Bestimmung der Schmelztemperaturverschiebungen untersucht. Die Durchführung erfolgte analog zu den 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen. Abbildung 55 zeigt die ermittelten T_m -shifts für die Proteinkinasen SRPK1, SRPK2 und CLK1 unter Zusatz der Verbindungen **20a-e**. Es wird deutlich, dass bei den SRPKs kein Anstieg der Schmelztemperatur nach Zugabe der Substanzen beobachtet wurde. Demnach ist davon auszugehen, dass die Affinität zu diesen Kinasen gering ist und somit ein inhibitorischer Effekt unwahrscheinlich ist. In den Untersuchungen an CLK1 zeigt die beobachtete Erhöhung der Schmelztemperaturen dagegen klar die erwartete Bindung der Substanzen an das Enzym. Die Verhältnisse der einzelnen T_m -shifts der Verbindungen korrelieren im Großen und Ganzen mit den qualitativen Unterschieden ihrer IC_{50} -Werte. Die Verbindungen **20a-c** weisen Schmelztemperaturverschiebungen zwischen 4.7-6.7 °C auf und besitzen IC_{50} -Werte im einstellig mikromolaren Bereich. Bei Verbindung **20d** konnte kaum eine Erhöhung der Schmelztemperatur beobachtet werden, was mit dem Ergebnis des radiometrischen Assays in Einklang steht. Dort wurde bis zu einer Konzentration von 10 µM keine Inhibition der CLK1 festgestellt. Allerdings wurde für Verbindung **20e** eine vergleichsweise hohe Schmelztemperaturverschiebung bestimmt, welche im Widerspruch zu der nicht detektierten Inhibition im radiometrischen Assay steht. Dies könnte jedoch in der Möglichkeit begründet sein, dass der IC_{50} -Wert der Verbindung bei einer Konzentration über 10 µM liegt. In dem verwendeten radiometrischen Assay wurden jedoch nur Werte unterhalb dieser Konzentration erfasst.



- 20a** $R^1 = 4\text{-Pyridyl}$, $R^2 = \text{COCH}_3$
20b $R^1 = 4\text{-Pyridyl}$, $R^2 = \text{H}$
20c $R^1 = 3\text{-Pyridyl}$, $R^2 = \text{COCH}_3$
20d $R^1 = 2\text{-Pyridyl}$, $R^2 = \text{COCH}_3$
20e $R^1 = \text{Phenyl}$, $R^2 = \text{COCH}_3$

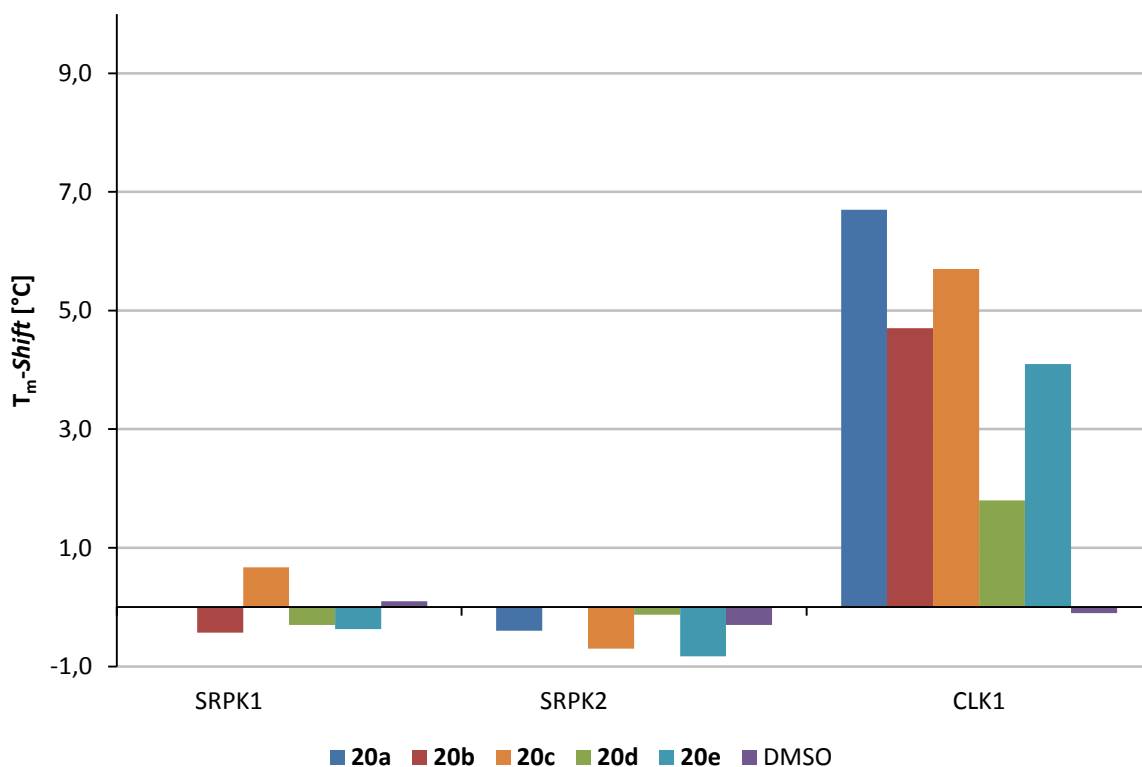


Abbildung 55: Verschiebung der Schmelztemperatur (T_m -shift, [°C]) von SRPK1, SRPK2 und CLK1 unter Zusatz der Verbindungen **20a-e**. SRPK1+2: Konzentration = 100 μM , Dreifach-Bestimmung; CLK1: Konzentration = 10 μM , Einfach-Bestimmung.

DSF-Analyse der 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide **19**

Als Vertreter der 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide wurde Verbindung **19h** analog zu den oben genannten Substanzklassen getestet, jedoch konnte für keines der untersuchten Proteine eine eindeutige Schmelztemperatur bestimmt werden, da die initiale Fluoreszenz in allen Fällen bereits zu hoch ausfiel. Für diese Beobachtung kommen zwei Hauptursachen in

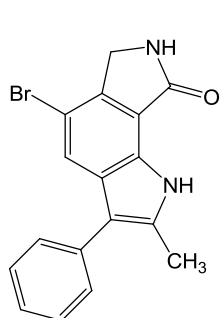
Frage. Zum einen könnte die Substanz eine Eigenfluoreszenz aufweisen, die die Fluoreszenz des Farbstoffs überdeckt. Zum anderen könnte eine geringe Löslichkeit der Verbindung im wässrigen Milieu des Assays zur Präzipitation führen, welche wiederum die Bindung des zugesetzten Farbstoffs an die Präzipitate bedingt, sodass es unabhängig von der Proteinfaltung zu einer messbaren Fluoreszenz kommt. Da im Vergleich zu den übrigen Verbindungen keine außergewöhnlich hohe Fluoreszenz der Verbindung beobachtet wurde, liegt die Ursache vermutlich in der geringen Löslichkeit unter den Versuchsbedingungen, sodass die Methode angepasst werden müsste, um sie für diese Substanz anwendbar zu machen.

8 Zusammenfassung

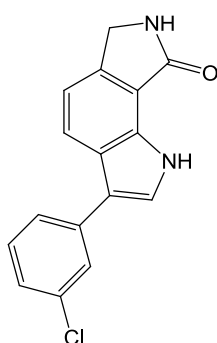
Das *splicing* von prä-mRNA im menschlichen Organismus erfüllt eine wichtige regulatorische Funktion in der Genexpression und der Proteinbiosynthese. Der Prozess wird unter anderem durch CLK- und DYRK-Kinasen beeinflusst, sodass Fehlfunktionen dieser Enzyme in der Pathogenese *splicing*-abhängiger Erkrankungen von Bedeutung sein können. Niedermolekulare CLK-Inhibitoren können daher in der Aufklärung der biologischen Zusammenhänge und als potentielle Wirkstoffe für neue Therapieansätze Verwendung finden.

8.1 Synthese neuer CLK-Inhibitoren

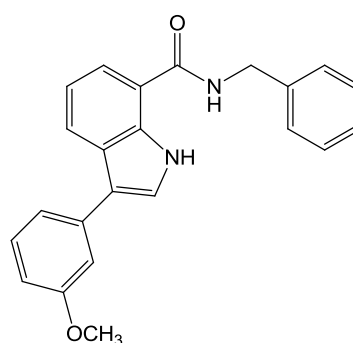
Durch Abwandlung der Struktur des Proteinkinaseinhibitors Indirubin wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one und 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide entworfen und synthetisiert. Mittels *docking*-Studien wurden Hypothesen über die Bindemodi in den ATP-Bindetaschen verschiedener Kinasen aufgestellt, die für die rationale Strukturmodifikation und die Erklärung der daraufhin beobachteten Aktivitätsunterschiede herangezogen wurden. Röntgenkristallstrukturanalysen von Komplexen einzelner Inhibitoren mit CLK1 oder CLK3 bestätigten die angenommenen Bindemodi. In radiometrischen Assays konnten Vertreter beider Stoffklassen als CLK1-Inhibitoren identifiziert werden, wobei sich **50a** als besonders potent und **17c** als besonders selektiv erwies.



50a, IC₅₀ CLK1 = 0.023 μM,
IC₅₀ DYRK1A = 0.110 μM



17c, IC₅₀ CLK1 = 0.088 μM,
IC₅₀ DYRK1A > 10 μM



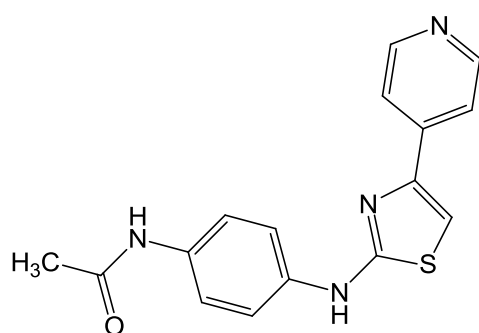
19h, IC₅₀ CLK1 = 0.740 μM,
IC₅₀ DYRK1A = 2.8 μM

Anhand der Aktivitäten verschieden substituierter 6,7-Dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen für den inhibitorischen Effekt dieser Klasse auf Kinasen der CLK-Familie aufgestellt werden. Die meisten der Vertreter zeigten gute Selektivität gegenüber anderen Kinasen der CMGC-Gruppe, mit Ausnahme der mit den CLKs

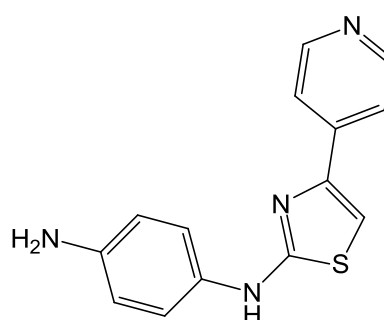
eng verwandten DYRK-Familie. Mit Verbindung **17c** konnte jedoch ein potenter, auch gegenüber den DYRK-Kinasen selektiver Inhibitor entwickelt werden. Die 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carboxamide waren hingegen sowohl an CLK1 als auch an DYRK1A nur schwach aktiv (**19h**) oder inaktiv.

8.2 Virtuelles Screening

Ausgehend von der ZINC Datenbank sowie der ChEMBL Kinase SARfari Datenbank wurde Verbindung **20a** im Rahmen eines virtuellen Screenings als moderater CLK-Inhibitor identifiziert.



20a, IC₅₀ CLK1 = 4.1 μM
IC₅₀ DYRK1A = 3.2 μM



20b, IC₅₀ CLK1 = 3.3 μM
IC₅₀ DYRK1A = 1.8 μM

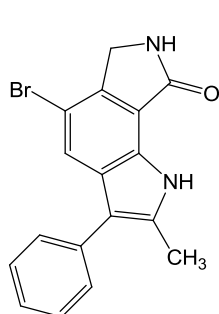
Durch die iterative Anwendung eindimensionaler Filter, einer 2D-*fingerprint*-Suche, einer Pharmakophor-Suche und einer *docking*-Untersuchung konnte die Größe der Molekül-Datenbank schrittweise reduziert werden. Basierend auf einer visuellen Inspektion der *docking*-Posen in CLK1 wurden zwölf strukturell verschiedenartige Verbindungen für die biologische Untersuchung ausgewählt. Bei dem Thiazol-Derivat **20a** handelte es sich um die einzige an CLK1 aktive Verbindung unter den Screening-Substanzen. Die Evaluation nachträglich kommerziell erworbener Derivate dieser Struktur führte zur Identifikation weiterer mikromolarer Inhibitoren von CLKs und DYRKs, u.a. **20b**. Aus den Ergebnissen ließ sich die Bedeutung der Position des Pyridin-Stickstoffatoms für die Aktivität dieser Substanzklasse ableiten.

9 Summary

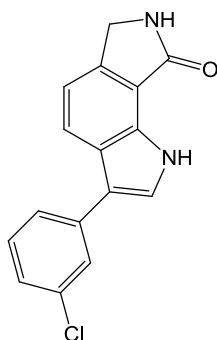
Splicing of pre-mRNA plays a major role in the regulation of gene expression and protein biosynthesis in human cells. Since this process is influenced by CLK and DYRK kinases, dysfunction of these enzymes may contribute to the development of splicing dependent diseases. Hence, small-molecule CLK inhibitors might be applicable as biological tools and potential drug candidates in novel concepts of therapy.

9.1 Synthesis of novel CLK inhibitors

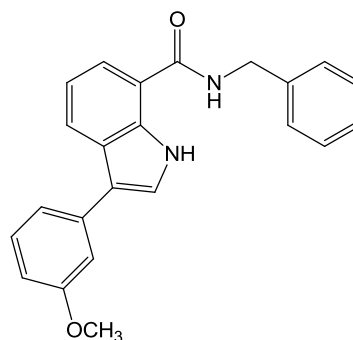
In this study, 3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ones and 3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamides were designed and synthesised by modification of the protein kinase inhibitor indirubin. Via docking, binding mode hypotheses in the ATP binding sites of several kinases were established and used as guidance for structure modifications and their effects on biological activity. Subsequently generated crystal structures of CLK1 and CLK3 in complex with selected inhibitors proved the proposed binding modes. In radiometric enzyme assays representatives of both compound classes could be identified as CLK1 inhibitors with **50a** being very potent and **17c** being very selective.



50a, IC_{50} CLK1 = 0.023 μ M,
 IC_{50} DYRK1A = 0.110 μ M



17c, IC_{50} CLK1 = 0.088 μ M,
 IC_{50} DYRK1A > 10 μ M

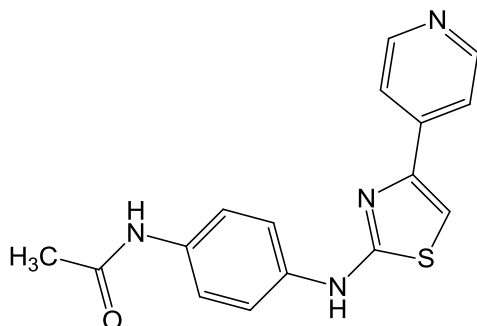


19h, IC_{50} CLK1 = 0.740 μ M,
 IC_{50} DYRK1A = 2.8 μ M

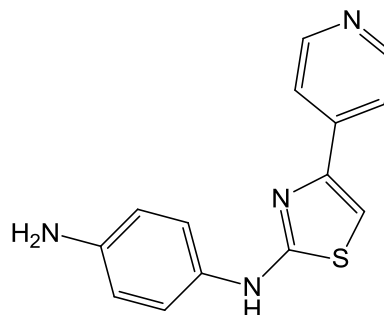
Based on the activity of differently substituted 6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-ones structure activity relationships of the inhibitory effect on CLK family kinases could be established. Most compounds displayed high selectivity against other members of the CMGC group, except regarding the DYRK family which is closely related to CLKs. However, with **17c** a potent inhibitor displaying selectivity against DYRK kinases could be developed. For the 3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamides either only weak inhibitory activity was observed in CLK1 and DYRK1A (**19h**) or no activity at all.

9.2 Virtual screening

Using the databases ZINC and ChEMBL Kinase SARfari as a starting point for a virtual screening, compound **20a** was identified as a moderate inhibitor of CLKs.



20a, IC_{50} CLK1 = 4.1 μ M
 IC_{50} DYRK1A = 3.2 μ M



20b, IC_{50} CLK1 = 3.3 μ M
 IC_{50} DYRK1A = 1.8 μ M

By iterative application of one-dimensional filtering, two-dimensional fingerprint search, pharmacophore search and molecular docking, the database size could be reduced in a stepwise manner. Based on visual inspection of docking poses in CLK1, twelve structurally diverse compounds were selected for biological testing. Among these, the thiazole derivative **20a** turned out to be the only compound exhibiting an inhibitory effect on CLK1. The evaluation of subsequently purchased derivatives lead to the identification of further micromolar inhibitors of CLKs and DYRKs, such as **20b**. Derived from the activity data, the importance of the position of the pyridyl nitrogen atom for the inhibitory effect of this compound class became obvious.

10 Experimenteller Teil

10.1 Geräte und Methoden

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Machery-Nagel, Düren; Detektion bei 254 nm und 366 nm; als Fließmittel wurden vorwiegend Gemische aus Toluol, Ethylacetat und Eisessig oder Toluol, Aceton und Triethylamin verwendet.

Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, analytisch

Gerät für die isokratische Elution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300 (40 °C), Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Gerät für die Gradientenelution: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, UV-Detector L-2400, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µM, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: 1-2 mg Substanz wurden in DMSO gelöst und mit Whatman™ UN203NPUORG Mini-UniPrep™ Syringeless Filtern filtriert.

Elution: Injektionsvolumen 2-10 µL; Flussrate 1.000 mL/min; Gesamtlaufzeit: 15 min bei isokratischer Elution und 22 min bei Gradientenelution; Verlauf der Gradientenelution sofern nicht anders angegeben nach folgendem Schema: (Acetonitril/Wasser) 0-2 min (10/90), 2-12 min (10/90→90/10, linear), 12-22 min (90/10); angestrebte Gesamtretentionszeit bei isokratischer Elution (t_N) 3-8 min; Totzeit (t_M).

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und Wasser (bidest.) oder Gemische aus Acetonitril und Triethylammoniumsulfat-Puffer pH 2.6 im angegebenen Verhältnis; Pufferherstellung: Lösung von Natriumhydroxid (242 mg) in einer Mischung aus Triethylamin (20 mL) und bidestilliertem Wasser (980 mL), sowie Einstellung des pH-Wertes mit Schwefelsäure (98%)

auf pH 2.6; Zur Messung mittels Gradientenelution wurden ausschließlich Gemische aus Acetonitril und Wasser (bidest.) verwendet.

Detektion: Isokratisch: DAD bei 254 nm und 280 nm; Gradient: UV bei 254 nm.

Auswertung: Verwendung der 100%-Methode nach Integration der Peakfläche, Integrationsausschluss von 0 min bis 1.60 min, *threshold* 1000 AU, Ableitung der Nettoretentionszeit (t_N), sowie der Totzeit (t_M) von der Retentionszeit des DMSO-Peaks, Absorptionsmaxima (λ_{\max}) entnommen aus den UV-Spektren des DAD, verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, präparativ

Gerät: LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector, Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser: 25 mm, ausgestattet mit einem Merck Selbstfüllstand NW25, Säulenmaterial Merck: LiChrospher® 100 RP-18 (12 μ m), Fa. Merck, Darmstadt; Probenschleife (max. Injektionsvolumen: 5 mL), Fa. Knauer Berlin.

Probenvorbereitung: Lösung der Probe in einem Gemisch aus DMSO und verwendetem Fließmittel zu maximal 4 mL Gesamtvolumen; Sandwich-Injektion.

Elution: Injektionsvolumen: 4 mL Probe, sowie 1 mL DMSO; Flussrate 40.000 mL/min; Gesamtlaufzeit: 15-45 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und bidestilliertem Wasser.

Detektion: UV-Detektor bei 254 nm.

Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Vermessung der Substanzen als Pressling im Gemisch mit Kaliumbromid.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 (^1H -NMR-Messung: 400 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance III-400 (^1H -NMR-Messung: 400 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 101 MHz), Bruker Avance 600 (^1H -NMR-Messung: 600 MHz, ^{13}C -NMR-Messung: 151 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig.

Lösungsmittel: d₆-DMSO.

Interner Standard: Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala.

¹H-NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

¹³C-NMR: Aufnahme der Spektren mit ¹H-Breitbandentkopplung; die Angabe (2C) verweist auf ein überlagertes Signal, welches entweder von zwei magnetisch äquivalenten Kohlenstoffatomen hervorgerufen wird oder durch zwei Signale entstanden ist, die sich in ihrer chemischen Verschiebung um weniger als 0.1 ppm unterscheiden.

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, gegebenenfalls Multiplizitäten wie dd = Dublett von Dubletts usw.

Lösungsmittel

Sofern nicht anders angegeben, wurden ungetrocknete Lösungsmittel eingesetzt. Eine Trocknung erfolgte, wenn angegeben, in Anlehnung an publizierte Methoden.¹¹⁴

Dichlormethan: Zur Vortrocknung wurde Dichlormethan (1 L) für 12 h über Kaliumhydroxid (3 g) gelagert. Nach dem Dekantieren wurde das Dichlormethan über Calciumhydrid (ca. 1 g) für 3 h refluxiert und anschließend destilliert. Lagerung über Molsieb (4 Å).

Tetrahydrofuran: Zur Vortrocknung wurde Tetrahydrofuran (1 L) für 12 h über Kaliumhydroxid (3 g) gelagert. Nach dem Dekantieren wurde das Tetrahydrofuran über Calciumhydrid (ca. 1 g) für 3 h refluxiert und anschließend destilliert. Lagerung über Molsieb (4 Å).

Massenspektrometrie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen; Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard Perfluorkerosin, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations $[\text{M}]^{+\bullet}$ oder des Signals $[\text{M-H}]^{+}$.

Die Untersuchungen wurden durch das Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Mikrowellen-Synthese

CEM fokussiertes MikrowellenTM Synthese System, Typ Discover; Chem DriverTM Application Software Program; Reaktionsgefäß: 10 mL mit Teflonseptum, Fa. CEM GmbH, Kamp-Lintfort; Jun-Air Kompressor, Blue Line Model 4, Fa. Jun-Air International, Nørresundby, Dänemark.

Röntgenkristallstruktur-Analyse kleiner organischer Moleküle

Datensammlung: Die Kristalle wurden in Inertöl auf Glasfäden montiert, in den Kaltgasstrom des Diffraktometers (Bruker SMART 1000 CCD) gebracht und mit monochromatisierter Mo-K α -Strahlung vermessen.

Strukturauflösung: Direkte Methoden.

Strukturverfeinerung und weitere numerische Einzelheiten: Kapitel 10.2 (Synthesen und analytische Daten, röntgenographische Daten).

Die Untersuchungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter G. Jones des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

Schmelztemperaturbestimmung

Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte in offenen Glaskapillaren mit einem Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

Bezug der Ausgangsmaterialien

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden über Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Enamine (Kiew, Ukraine) und Sigma Aldrich (Columbia, SC, USA) bezogen.

10.2 Synthesen und analytische Daten

AAV1: Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 zur Diazotierung und Reduktion von 7-Aminoisoindolin-1-onen **23a-d** zu den Hydrazinen **25a-d**

Das entsprechende 7-Amino-isoindolin-1-on (1 äq.) wird in Salzsäure (37%, 10 mL) suspendiert, mit Eis (7-9 g) versetzt und bei $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Unter Beibehaltung der Temperatur wird tropfenweise eine Lösung von Natriumnitrit (1.1 äq.) in Wasser (6 mL) hinzugegeben. Es wird gerührt bis eine klare Lösung entsteht. Eine Suspension aus Zinn(II)chlorid-Dihydrat (3 äq.) in Salzsäure (37%, 10 mL) wird in einem zweiten Kolben auf $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Der Inhalt des ersten Kolbens wird vollständig in den zweiten Kolben gegossen. Anschließend wird das Gemisch 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann über Nacht bei $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Petrolether gewaschen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

AAV2: Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 zur Synthese von Phenylacetaldehyden **27a-d**

Methode A:

Der entsprechende Benzylalkohol (5.00 mmol) wird unter Stickstoffbegasung in Dichlormethan (50 mL) gelöst. Frisch verriebenes Pyridiniumchlorochromat (PCC, 1620 mg, 7.50 mmol) wird hinzugefügt, dann wird das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird über eine mit Kieselgel gefüllte Fritte (Schichtdicke 4 cm) filtriert, wobei das Produkt mit Ethylacetat (50 mL) eluiert wird. Das Filtrat wird unter Vakuum zur Trockene eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

Methode B:

Der entsprechende Benzylalkohol (3.72 mmol) wird in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) gelöst. Es werden Kaliumbromid (66 mg, 0.6 mmol), Natriumhydrogencarbonat (625 mg, 7.44 mmol), TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl) (6 mg, 0.6 mmol) und Wasser (10 mL) hinzugefügt. Die Mischung wird im Eiswasserbad auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, dann wird Natriumhypochlorit-Lösung ($c = 0.68\text{ mol/L}$, 3 äq.) tropfenweise über 10 min hinzugegeben. Es wird für 2 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird die Mischung mit Ethylacetat (20 mL) verdünnt und über eine mit Kieselgel gefüllte Fritte filtriert (Schichtdicke 4 cm). Das Filtrat wird über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt. Die erhaltenen Öle wurden als Rohprodukte weiter verwendet.

AAV3: Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 zur Fischer-Indol-Synthese von 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen (**17a-h**, **21a-b**, **50a**), 3-Aryl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**) und 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure (**60**)

Das entsprechend substituierte 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a-d**, 1 äq.) bzw. 2-Hydrazinylbenzoesäure-Hydrochlorid (**55**, 1 äq.) wird mit Natriumacetat (1 äq.) und dem entsprechenden Keton, Phenylacetaldehyd oder Phenylacetaldehyddimethylacetal (1 äq.) in Eisessig (10 mL) suspendiert und im Ölbad bei 90-100 °C 3.5 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Mischung in einen Scheidetrichter überführt und mit Natriumacetat-Lösung (5%, 20 mL) sowie Wasser (30 mL) versetzt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (5 x 30 mL) ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und unter Zugabe von Kieselgel (1.5 g) zur Trockene eingeeengt. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie, wobei eine Mischung aus Toluol, Ethylacetat und Eisessig im angegebenen Verhältnis als Elutionsmittel verwendet wird. Umkristallisation aus Ethanol 80%.

AAV4: Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 zur Fischer-Indol-Synthese von 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen **17i-k** und 3-Aryl-1*H*-indol-7-carbonsäuren **56b-c** aus Styrenen

tert-Butylalkohol (5 mL) wird auf 85 °C erhitzt und zu einer Mischung aus Bisacetonitrilpalladium(II)chlorid (0.02 äq.) und *p*-Benzochinon (0.7 äq.) gegeben. Anschließend wird Wasser (0.5 äq.) sowie das entsprechende Styren (**38**, 0.6 äq.) hinzugefügt und 1 h bei 85 °C gerührt. Die Mischung wird auf dem Eisbad bis zum Erstarren gekühlt und danach auf 30 °C temperiert. 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25a**) -Suspension bzw. 2-Hydrazinylbenzoesäure-Hydrochlorid (**55**) -Suspension (1 äq.) wird hinzugegeben und die Mischung wird bei 50 °C 2.5 h gerührt. Es wird Wasser (10 mL) hinzugefügt, die Mischung in einen Scheidetrichter überführt und nach Zugabe weiteren Wassers (20 mL) mit Ethylacetat (5 x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie, wobei eine Mischung aus Toluol, Ethylacetat und Eisessig im angegebenen Verhältnis als Elutionsmittel verwendet wird. Anschließend wird aus dem angegebenen Lösemittel umkristallisiert.

Die Hydrazin-Hydrochlorid-Suspension wird durch Suspendieren von 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol) bzw. 2-Hydrazinylbenzoesäure-Hydrochlorid (**55**, 189 mg, 1.00 mmol) in Schwefelsäure (98%, 0.88 mL), Wasser (1.46 mL) und Ethanol (96%, 4.39 mL) hergestellt.

AAV5: Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 für die Suzuki-Kupplung zu 5-Aryl-substituierten 3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen **21c-e**

5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (1 äq.), Phenylboronsäure (1.5 äq.), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0.04 äq.) und Cäsiumcarbonat (3 äq.) werden in einem Gemisch aus Toluol und Ethanol (2 mL + 1 mL) in einem Mikrowellenglas suspendiert. Die Reaktion wird in der Synthese-Mikrowelle bei folgenden Einstellungen durchgeführt: *ramp time* 5 min, Reaktionszeit 20 min, Maximaltemperatur 150 °C, Maximaldruck 250 psi, Leistung 200 W. Der Reaktionsansatz wird auf eine mit Kieselgel gefüllte Fritte (3 cm Höhe) gegeben und das Rohprodukt mit Ethylacetat (50 mL) eluiert.

AAV6: Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 zur Amid-Synthese für die Bildung von 3-Aryl-1*H*-indol-7-carbonsäureamiden (**19a-e**, **19g-h**, **19j-r**)

Die 3-Aryl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a-c**, 1.0 äq.) wird in DMF (Uvasol, 1 mL) suspendiert und bei 0 °C auf dem Eisbad gerührt. Es werden das Amin (1.15 äq.), Diisopropylethylamin (DIPEA, 4.6 äq.) und PyBOP (1.2 äq.) hinzugefügt. Die Mischung wird unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Die entstandene Lösung wird in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und mit Salzsäure (0.1 M, 50 mL) extrahiert. Anschließend wird die organische Phase in angegebener Reihenfolge mit Wasser (50 mL), Natriumhydroxid-Lösung (0.1 M, 50 mL) und Wasser (50 mL) erneut extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und über eine mit Kieselgel (3-4 cm Schichtdicke) gefüllte Fritte filtriert. Nach wiederholtem Trocknen des Filtrats über Na₂SO₄ wird die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mittels Umkristallisation.

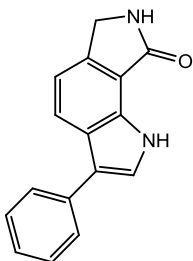
AAV7: Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 zur Synthese von 1-Alkyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-onen **22a-e**

3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (1 äq.) wird in Aceton (10 mL) gelöst. Bei Raumtemperatur wird Kalium-*tert*-butylat (1 äq.) hinzugefügt und für 1 h gerührt. Anschließend wird das entsprechende Halogenalkan (10 äq.) hinzugefügt und bei

gleichbleibender Temperatur für weitere 24 h gerührt. Zur entstandenen Suspension werden Ethylacetat (30 mL), sowie Kieselgel (ca. 1.5 g) hinzugegeben, dann wird die Mischung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie und Umkristallisation.

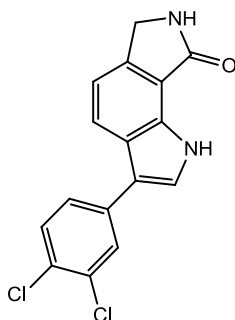
AAV8: Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 zur Synthese von 3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17o**), 3-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-methyl-1*H*-indol-7-carboxamid (**19f**) und *N*-Benzyl-3-(3-hydroxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (**19i**):

Das Methoxyphenyl-substituierte Derivat (1.00 äq.) wird unter Stickstoffbegasung in getrocknetem Dichlormethan gelöst (28 mL). Nach dem Hinzufügen von Bortribromid gelöst in Dichlormethan ($c = 1 \text{ M}$, 5.00 äq.) wird der Reaktionsansatz 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Wasser (28 mL) hinzugefügt und für eine weitere Stunde bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und mit Wasser (20 mL) gewaschen, das Filtrat wird mit Ethylacetat (5 x 30 mL) extrahiert. Danach wird der Niederschlag in den vereinten organischen Phasen gelöst, die Lösung über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus dem angegebenen Lösemittel.

3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**):

Nach AAV3 aus Phenylacetaldehyddimethylacetal (665 μL , 4.00 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 798 mg, 4.00 mmol) und Natriumacetat (328 mg, 4.00 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (5/5/0.5) als Elutionsmittel. Es wurden 307 mg (31%) des Produkts in Form gelber Kristalle isoliert.

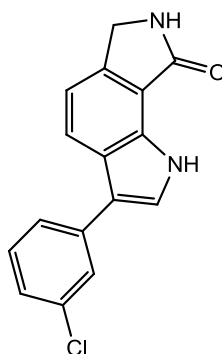
Schmp.: 294-295 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3435 cm^{-1} (NH), 3200 cm^{-1} , 3073 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.47 (s, 2H, CH_2), 7.22-7.32 (m, 2H, ArH), 7.40-7.50 (m, 2H, ArH), 7.61 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.66-7.75 (m, 2H, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.78 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 45.6 (CH_2), 114.7, 122.8, 123.9, 125.6, 126.9 (2C), 128.8 (2C) (CH), 116.3, 116.6, 125.3, 130.9, 135.3, 139.6, 170.4 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ (248.3); ber. C 77.42, H 4.84, N 11.29; gef. C 77.19, H 4.70, N 11.03; MS (EI): m/z (%) = 248.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M-H}]^+$ ber. 247.08659, gef. 247.08545; HPLC (isokr.): 98.0% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm; $t_N = 4.0$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 98.3% bei 254 nm, $t_N = 11.2$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21$ min; $\lambda_{\text{max}} = 238$ nm, 266 nm, 308 nm.

3-(3,4-Dichlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17b**):

Nach AAV3 aus 3,4-Dichlorphenylacetaldehyd (**27b**, 284 mg, 1.50 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol). Das Produkt wurde als weißer Feststoff isoliert (30 mg, 10%).

Schmp.: 258-259 °C; IR (KBr): 3345 cm^{-1} und 3356 cm^{-1} (NH), 1672 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.48 (s, 2H, CH_2), 7.31 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 7.74 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, 2.1 Hz, ArH), 7.80 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 7.94 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.95 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 45.6 (CH_2); 115.2, 122.5, 125.4, 126.7, 128.0, 130.9 (CH); 113.8, 116.8, 124.8, 127.6, 130.8, 131.5, 136.2, 139.8, 170.3 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ (317.2); MS (EI): m/z (%): 316 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 316.01647, gef. 316.01636; HPLC (isokr.): 97.4% bei 254 nm und 98.3% bei 280 nm, $t_N = 5.5$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 96.2% bei 280 nm, $t_N = 13.7$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21$ min; $\lambda_{\text{max}} = 229$ nm, 286 nm.

3-(3-Chlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17c**):

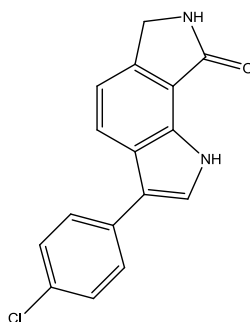


Nach AAV3 aus 3-Chlorphenylacetaldehyd (**27c**, 232 mg, 1.50 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol). Es wurden 57 mg (20%) des Produkts als rotbraunes Pulver isoliert.

Schmp.: 215-216 °C; IR (KBr): 3445 cm^{-1} , 3423 cm^{-1} und 3362 cm^{-1} (NH), 1660 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.48 (s, 2H, CH_2), 7.31 (m, 2H, ArH), 7.47 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 7.71 (m, 3H, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.48 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.91 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 45.6 (CH_2); 115.1, 122.6, 124.96, 125.02, 125.3, 126.2, 130.7 (CH); 114.8, 116.7, 124.98, 130.9, 133.5, 137.5, 139.8, 170.3 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ (282.7); ber. C 67.97, H 3.92, N 9.91; gef. C 68.13, H 3.86, N 9.69; MS

(EI): m/z (%): 282 $[M]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[M-H]^+$ ber. 281.04762, gef. 281.04697; HPLC (isokr.): 98.2% bei 254 nm und 99.0% bei 280 nm; t_N = 3,5 min, t_M = 1.06 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 94.7% bei 254 nm, t_N = 12,4, t_M (DMSO) = 1.20 min; λ_{max} = 272 nm, 305 nm.

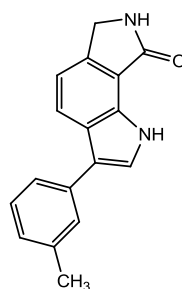
3-(4-Chlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*q*]indol-8-(1*H*)-on (**17d**):



Nach AAV3 aus 4-Chlorphenylacetaldehyd (**27d**, 155 mg, 1.00 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol). Es wurden 59 mg (20.9%) des Produkts als weißlich-gelbes Pulver isoliert.

Schmp.: 255-257 °C; IR (KBr): 3429 cm^{-1} und 3217 cm^{-1} (NH), 2914 cm^{-1} , 2857 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.47 (s, 2H, CH_2), 7.28 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 7.48 (d, 2H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, ArH), 7.74 (d, 2H, J = 8.5 Hz, ArH), 8.06 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.86 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 45.6 (CH_2); 114.9, 122.7, 124.5, 128.4 (2C), 128.7 (2C) (CH); 115.0, 116.7, 125.0, 130.0, 130.9, 134.2, 139.7, 170.4 (C); $C_{16}H_{11}ClN_2O$ (282.72); ber. C 67.97, H 3.92, N 9.91; gef. C 66.67, H 4.02, N 9.47; MS (EI): m/z (%): 282 $[M]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[M]^+$ ber. 282.05544, gef. 282.05486; HPLC (isokr.): 99.5% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; t_N = 3.75 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60:40); HPLC (grad.): 94.4% bei 280 nm, t_N = 12.64 min, t_M (DMSO) = 1.22 min; λ_{max} = 274 nm.

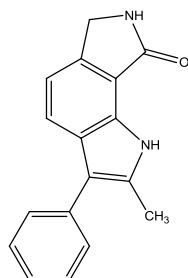
3-(3-Methylphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*q*]indol-8-(1*H*)-on (**17e**):



Nach AAV3 aus 3-Methylphenylacetaldehyd (**27e**, 141 mg, 1.10 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol). Es wurden 36 mg (14%) des Produkts als hellgelbes Pulver erhalten.

Schmp.: 231-232 °C; IR (KBr): 3424 cm^{-1} und 3261 cm^{-1} (NH), 1682 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 2.38 (s, 3H, CH_3) 4.47 (s, 2H, CH_2), 7.08 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, ArH), 7.27 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.33 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.50 (m, 2H, ArH), 7.58 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH) 8.45 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.75 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 21.2 (CH_3); 45.6 (CH_2); 114.6, 122.9, 123.9, 124.0, 126.3, 127.5, 128.7 (CH); 116.4, 116.6, 125.3, 130.8, 135.2, 137.9, 139.5, 170.5 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (262.11); ber. C 77.84, H 5.38, N 10.68; gef. C 73.98, H 5.56, N 9.83; MS (EI): m/z (%): 262 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 262.11006, gef. 262.10972; HPLC (isokr.): 99.7% bei 254 nm und 96.4% bei 280 nm; $t_N = 5.1$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 95.6% bei 254 nm; $t_N = 11.7$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21$ min; $\lambda_{\text{max}} = 267$ nm, 308 nm.

2-Methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17f**):



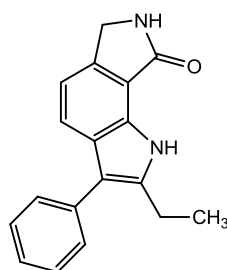
Nach AAV3 aus 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 2.00 mmol, 399 mg), Phenylacetone (2.00 mmol, 270 μL) und Natriumacetat (2.00 mmol, 164 mg). Es wurden 102 mg (19.4%) als braunes Pulver erhalten.

Um eine HPLC-Reinheit größer 95.0% zu erreichen, wurde zusätzlich aus Toluol/Hexan (2+1) und aus Ethanol (80%) umkristallisiert.

Schmp.: 245-247 °C; IR (KBr): 3420 cm^{-1} (NH), 3220 cm^{-1} , 1684 cm^{-1} (C=O), 1637 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 2.50 (s, 3H, CH_3), 4.44 (s, 2H, CH_2), 7.16 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.25-7.36 (m, 1H, ArH), 7.43-7.53 (m, 4H, ArH), 7.72 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.38 (s, 1H,

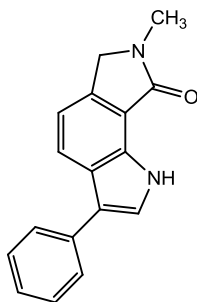
Pyrrolidinon-NH), 11.57 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 12.1 (CH_3); 45.5 (CH_2); 114.1, 121.4, 125.5, 128.5 (2C), 128.89 (2C) (CH); 112.8, 115.7, 127.2, 129.4, 133.4, 135.1, 138.5, 170.5 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (262.3); ber. C 77.84, H 5.38, N 10.68; gef. C 76.04, H 5.29, N 10.43; MS (EI): m/z (%) = 262.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 262.11006, gef. 262.10970; HPLC (isokr.): 99.0% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm; t_N = 3.19 min, t_M = 1.06 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-13 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 13-20 min (90/10), 97.0% bei 254 nm, t_N = 11.6 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.15 min; λ_{max} = 241 nm, 268 nm, 307 nm.

2-Ethyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17g**):



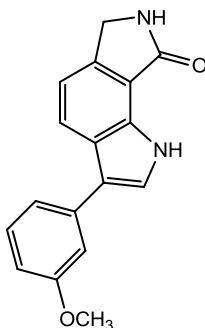
Nach AAV3 aus 1-Phenylbutan-2-on (300 μL , 2.00 mmol), 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 399 mg, 2.00 mmol) und Natriumacetat (164 mg, 2.0 mmol). Nach Umkristallisation wurden 131 mg (24%) gelbe, nadelförmige Kristalle erhalten.

Schmp.: 165-170 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3192 cm^{-1} (NH), 3058 cm^{-1} , 2963 cm^{-1} , 1671 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 1.26 (t, 3H, J = 7.4 Hz, Ethyl- CH_3), 2.84 (q, 2H, J = 7.5 Hz, Ethyl- CH_2), 4.44 (s, 2H, CH_2), 7.16 (d, 2H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.26 – 7.36 (m, 1H, ArH), 7.41- 7.53 (m, 4H, ArH), 7.67 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 8.40 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.56 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 15.2 (CH_3); 19.0, 45.5 (CH_2); 114.1, 121.6, 125.8, 128.6 (2C), 129.1 (2C) (CH); 112.5, 115.8, 127.3, 129.5, 135.1, 138.8, 139.3, 170.6 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (276.3); ber. C 78.24, H 5.84, N 10.14; gef. C 76.79, H 6.79, N 9.73; MS (EI): m/z (%) = 276.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 276.12571, gef. 276.12606; HPLC (isokr.): 98.7% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm; t_N = 4.0 min, t_M = 1.08 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 98.0% bei 254 nm, t_N = 12.6 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.19 min; λ_{max} = 242 nm, 266 nm, 308 nm.

7-Methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17h**):

Nach AAV3 aus Phenylacetaldehyddimethylacetal (166 μ L, 1.00 mmol), 2-(2-Methyl-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25b**, 214 mg, 1.00 mmol) und Natriumacetat (82 mg, 1.0 mmol). Das Produkt fiel als grau-weißes Pulver an (82 mg, 31%).

Schmp.: 265-267 °C; IR (KBr): 3306 cm^{-1} (NH), 3053 cm^{-1} (CH, aromatisch), 2911 cm^{-1} (CH, aliphatisch), 1659 cm^{-1} (C=O), 1600 cm^{-1} (C=C, Aromat); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.13 (s, 3H, CH_3), 4.42 (s, 2H, CH_2), 7.24-7.30 (m, 2H, ArH), 7.41-7.48 (m, 2H, ArH), 7.62 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.67-7.74 (m, 2H, ArH), 8.06 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 11.78 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 28.9 (CH_3); 52.1 (CH_2); 114.3, 122.5, 124.1, 125.7, 126.9 (2C), 128.9 (2C) (CH); 116.3, 116.4, 125.4, 130.5, 135.2, 136.9, 167.6 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (262.3); ber. C 77.84, H 5.38, N 10.68; gef. C 77.70, H 5.30, N 10.56; MS (EI): m/z (%) = 262.1 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokrat.): 99.6% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm; t_N = 3.3 min, t_M = 1.07 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 99.7% bei 254 nm, t_N = 10.6 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.17 min; λ_{max} = 265 nm, 309 nm.

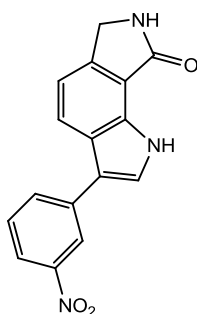
3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17i**):

Nach AAV4 aus 3-Methoxystyren (275 μ L, 2.00 mmol), 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25a**, 1.44 g, 4.00 mmol), *p*-Benzochinon (249 mg, 2.36 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (13 mg, 50 μ mol) und Wasser (41 μ L, 2.0 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung

mit Toluol/Ethylacetat/Eisessig (5/5/0.5) als Elutionsmittel und Umkristallisation aus Ethanol (80%) wurden 154 mg (27.7%) des Produkts als rote Kristalle erhalten.

Schmp.: 207-208 °C; IR (KBr): 3397 cm^{-1} und 3246 cm^{-1} (NH), 3019 cm^{-1} , 2947 cm^{-1} , 2827 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 3.83 (s, 3H, CH_3), 4.47 (s, 2H, CH_2), 6.84 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, 2.6 Hz, ArH), 7.20-7.38 (m, 4H, ArH), 7.64 (d, 1H, J = 2.6 Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 8.43 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.77 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 54.7 (CH_3); 45.4 (CH_2); 111.2, 111.9, 114.5, 119.0, 122.5, 123.9, 129.5 (CH); 116.3, 116.6, 125.3, 130.9, 136.5, 136.6, 139.5, 159.7 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (278.3); ber. C 73.37, H 5.07, N 10.07; gef. C 72.96, H 4.92, N 10.01; MS (EI): m/z (%) = 278.1 $[\text{M}]^{++}$ (100); HPLC (isokrat.): 99.4% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm; t_N = 3.3 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.03 min (ACN/Wasser = 45/55); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-22 min (90/10), 96.5% bei 254 nm, t_N = 10.9 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.20 min; λ_{max} = 267 nm, 305 nm.

3-(3-Nitrophenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17j**):

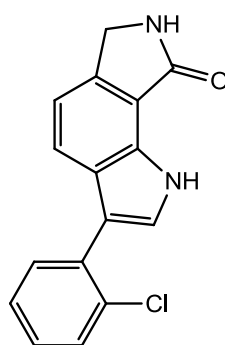


Nach AAV4 aus 3-Nitrostyren (70 μL , 0.50 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25a**, 199 mg, 1.00 mmol), *p*-Benzochinon (62 mg, 0.6 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (3 mg, 13 μmol) und Wasser (10.2 μL , 0.50 mmol). Abweichend von AAV4 wurde das Hydrazinhydrochlorid in Eisessig (5.8 mL) suspendiert und 1 h vor Beendigung der Reaktion Schwefelsäure (98%, 0.1 mL) hinzugefügt. Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Cyclohexan/Ethylacetat (1/3) als Elutionsmittel und Umkristallisation aus Ethanol 80% wurden 15 mg (10.2%) des Produkts als gelbbraunes Pulver erhalten.

Schmp.: 237-238 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3401 cm^{-1} , 3280 cm^{-1} (NH), 1686 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.49 (s, 2H, CH_2), 7.35 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 7.73 (t, 1H, J = 8.0 Hz, ArH), 7.90 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 8.10 (m, 2H, ArH), 8.20 (dt, 1H, J = 1.3 Hz,

7.9 Hz, ArH), 8.48 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.51 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 12.04 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 45.7 (CH_2); 115.4, 120.1, 120.6, 122.3, 125.7, 130.3, 133.1 (CH); 114.1, 116.9, 124.9, 131.0, 137.1, 140.0, 148.4, 170.3 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ (293.78); ber. C 65.53, H 3.78, N 14.33 gef. C 63.89, H 3.81, N 13.82; MS: (EI): m/z (%): 293.1 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 293.07949, gef. 293.07913; HPLC (isokr.): 98.7% bei 256 nm und 98.9 % bei 280 nm; $t_N = 3.65$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 89.4% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm; $t_N = 10.6$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.20$ min; $\lambda_{\text{max}} = 232$ nm, 269 nm.

3-(2-Chlorphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17k**):

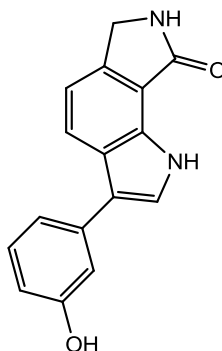


Nach AAV4 aus 2-Chlorstyren (127 μL , 1.00 mmol), 2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25a**, 399 mg, 2.00 mmol), *p*-Benzochinon (125 mg, 1.18 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (7 mg, 25 μmol) und Wasser (21 μL , 1.0 mmol). Nach säulenchromatographischer Reinigung mit Toluol/Ethylacetat/Eisessig (5/5/0.5) als Elutionsmittel und Umkristallisation aus Toluol/Hexan (2+1) wurden 22 mg (7.8%) des Produkts als beiges Pulver erhalten.

Schmp.: 234-235 $^\circ\text{C}$; IR (KBr): 3439 cm^{-1} (NH), 3200 cm^{-1} , 3070 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): 4.42 (s, 2H, CH_2), 7.23 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.33-7.39 (m, 1H, ArH), 7.43 (dt, 1H, $J = 1.4$ Hz, 7.5 Hz, ArH), 7.51 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.57 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, 7.62 Hz, ArH), 7.60 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz, 8.0 Hz, ArH), 7.66 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 8.87 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 45.6 (CH_2); 114.5, 122.9, 125.7, 127.2, 128.0, 129.9, 131.9 (CH); 113.3, 116.5, 126.1, 129.8, 132.1, 133.4, 139.5, 170.3 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ (282.7); ber. C 67.97, H 3.92, N 9.91; gef. C 68.01, H 3.68, N 9.84; MS (EI): m/z (%) = 282.1 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokr.): 99.4% bei 254 nm und 99.2% bei

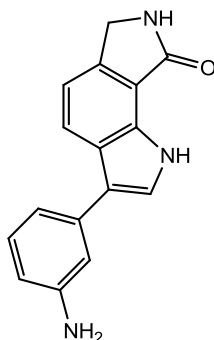
280 nm; $t_N = 4.6$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.05$ min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 98.0% bei 254 nm, $t_N = 11.5$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 229$ nm, 305 nm.

3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17l**):



Nach AAV8 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17a**, 167 mg, 0.60 mmol) und Bortribromid gelöst in Dichlormethan ($c = 1$ M, 3 mL, 3 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol (80%). Das Produkt wurde in Form brauner Kristalle erhalten (53 mg, 33.4%).

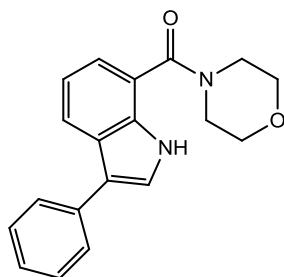
Schmp.: 235-236 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3386 cm^{-1} (NH), 3222 cm^{-1} (NH), 1656 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.47 (s, 2H, CH_2), 6.67 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, 2.3 Hz, 8.1 Hz, ArH), 7.11 (m, 2H, ArH), 7.23 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.27 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 7.53 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.45 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 9.39 (s, 1H, Phenol-OH), 11.73 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 45.6 (CH_2), 112.7, 113.7, 114.6, 117.7, 122.8, 123.7, 129.8 (CH), 116.5, 116.6, 125.3, 130.8, 136.4, 139.5, 157.7, 170.5 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (264.3); ber. C 72.72, H 4.58, N 10.60; gef. C 72.28, H 4.71, N 10.15; MS (EI): 264.1 m/z (%): $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.3% bei 256 nm und 99.9% bei 280 nm; $t_N = 4.64$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 30/70); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90→70/30, linear), 10-10.5 min (70/30→90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 96.9% bei 254 nm, $t_N = 7.9$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 265$ nm, 305 nm.

3-(3-Aminophenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17m**):

3-(3-Nitrophenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17j**, 71 mg, 0.2 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (216 mg, 0.96 mmol) werden unter Eiskühlung mit Salzsäure (37%, 8 mL) versetzt und dann langsam auf 80 °C erwärmt. Nachdem 30 min bei 80 °C gerührt wurde, wird erneut Salzsäure (37%, 4 mL) hinzugegeben und weitere 30 min unter Abkühlen auf Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung (10 M) unter Eiskühlung neutralisiert und anschließend mit Ethylacetat (5 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingengt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Ethanol/Ethylacetat/Triethylamin als Elutionsmittel (2/6/2). Das Produkt wurde als gelb-bräunliches Öl erhalten (37 mg, 58.2%)

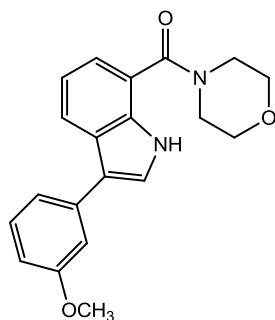
Die Verbindung konnte nicht mit einer für die vollständige Charakterisierung ausreichenden Reinheit und Menge isoliert werden.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm)= 4.46 (s, 2H, CH₂), 5.09 (s, 2H, NH₂), 6.48 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.84 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 6.94 (t, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 7.07 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.45 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 8.43 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 11.64 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm)= 45.5 (CH₂); 111.6, 112.4, 114.3, 114.7, 123.0, 123.2, 129.2 (CH), 116.4, 117.1, 125.3, 130.7, 135.6, 139.3, 148.9, 170.4 (C); C₁₆H₁₃N₃O (263.3).

Morpholino(3-phenyl-1*H*-indol-7-yl)methanon (**19a**):

Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 119 mg, 0.50 mmol), Morpholin (50 μ L, 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und PyBOP (295 mg, 0.57 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol. Das Produkt wurde in Form eines weißlich-gelben Pulvers erhalten (90 mg, 60.1%).

Schmp.: 220-221 °C ; IR (KBr): 3442 cm^{-1} (NH), 3167 cm^{-1} , 1591 cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.62 (s, 8H, CH_2), 7.13-7.19 (m, 2H, ArH), 7.26 (tt, 1H, J = 1.3 Hz, 7.5 Hz, ArH), 7.41-7.47 (m, 2H, ArH), 7.66-7.72 (m, 3H, ArH), 7.89-7.98 (m, 1H, ArH), 11.39 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 45.8, 66.1 (CH_2), 119.3, 120.2, 120.4, 124.4, 125.5, 126.7 (2C), 128.8 (2C) (CH), 116.1, 119.7, 125.8, 133.2, 135.3, 167.4 (C); $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ (306.4): ber. C 74.49, H 5.92, N 9.14, gef. C 74.40, H 5.98, N 8.91; MS: (EI): m/z (%): 306.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 4.0 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.04 min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-22 min (90/10), 97.2% bei 254 nm; t_N = 10.5 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.17 min; λ_{max} = 267 nm.

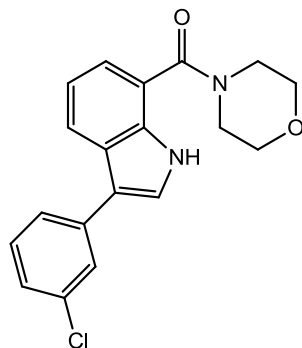
(3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-yl)(morpholino)methanon (**19b**):

Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56b**, 101 mg, 0.38 mmol), Morpholin (38 μ L, 0.43 mmol), Diisopropylethylamin (300 μ L, 1.75 mmol) und PyBOP

(224 mg, 0.43 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Cyclohexan (1+1). Es wurden 69 mg (54.0%) des Produktes als beiges Pulver isoliert.

Schmp.: 134-137 °C; IR (KBr): 3416 cm^{-1} (NH), 3230 cm^{-1} (NH), 1602 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): 3.66 (s, 8H, CH_2), 3.83 (s, 3H, CH_3), 6.83 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.6 Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.12-7.18 (m, 2H, ArH), 7.21 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, 2.6 Hz, ArH), 7.27 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 1.6 Hz, 7.6 Hz, ArH), 7.35 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 7.71 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.90-7.96 (m, 1H, ArH), 11.40 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 54.9 (CH_3), 45.8, 66.0 (CH_2), 111.2, 111.9, 119.0, 119.2, 120.1, 120.4, 124.6, 129.7 (CH), 115.9, 119.6, 125.7, 133.0, 136.6, 159.6, 167.3 (C); $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ (336.4): ber. C 71.41, H 5.99, N 8.33 gef. C 71.28, H 5.98, N 8.07; MS: (EI): m/z (%): 336.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokrat.): 99.7% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm; $t_N = 3.7$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.04$ min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-22 min (90/10), 98.5% bei 254 nm, $t_N = 10.3$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.17$ min; $\lambda_{\text{max}} = 233$ nm, 268 nm.

(3-(3-Chlorphenyl)-1H-indol-7-yl)(morpholino)methanon (**19c**):

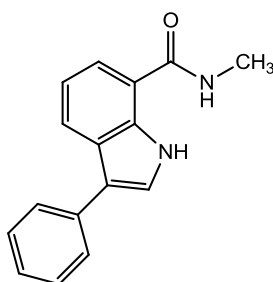


Nach AAV6 aus 3-(3-Chlorphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (**56c**, 47 mg, 0.2 mmol), Morpholin (20 μL , 0.2 mmol), Diisopropylethylamin (135 μL , 0.78 mmol) und PyBOP (104 mg, 0.2 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (3+1). Es wurden 31 mg (53.5%) des Produktes als rötlich-braunes Pulver isoliert.

Schmp.: 172-173 °C ; IR (KBr): 3431 cm^{-1} (NH), 3162 cm^{-1} (NH), 1595 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 4.22 (s, 8H, Morpholin- CH_2), 7.73-7.80 (m, 2H, ArH), 7.86 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.1 Hz, 8.0 Hz, ArH), 8.08 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.20-8.25 (m, 2H, ArH), 8.29 (t, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 8.53 (ddd, 1H, $J = 0.7$ Hz, 1.7 Hz, 7.5 Hz, ArH), 11.54 (s, 1H, Indol-

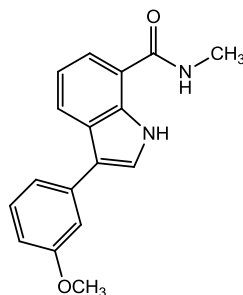
NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 45.8, 66.5 (CH_2), 119.7, 120.7, 120.9, 125.0, 125.5, 125.6, 126.6, 130.5 (CH), 115.4, 119.8, 126.1, 133.9, 134.1, 137.8, 168.0; $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$ (340.8): ber. C 66.96, H 5.03, N 8.22, gef. C 67.41, H 5.00, N 8.14; MS: (EI): m/z (%): 340.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.8% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 6.3 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.04 min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 98.7% bei 254 nm, t_N = 11.7 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.17 min; λ_{max} = 272 nm, 305 nm.

N-Methyl-3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamid (**19d**):



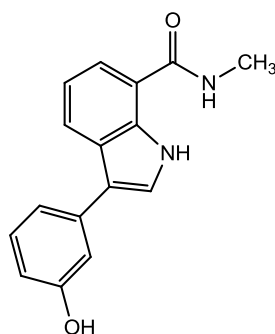
Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 178 mg, 0.75 mmol), Methylamin in THF (c = 2.00 M, 430 μL , 0.87 mmol), Diisopropylethylamin (585 μL , 3.45 mmol) und PyBOP (448 mg, 0.86 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol (96%). Es wurden 91 mg (48.5%) des Produktes als hellgelbe Nadeln isoliert.

Schmp.: 165-166 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3347 cm^{-1} (NH), 1618 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 2.87 (d, 3H, J = 4.5 Hz, CH_3), 7.17 (t, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 7.22-7.30 (m, 1H, ArH), 7.40-7.49 (m, 2H, ArH), 7.64 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 7.66 (m, 3H, ArH), 8.02 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 8.56 (q, 1H, J = 4.5 Hz, Amid-NH), 11.38 (d, 1H, J = 2.2 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 25.9 (CH_3), 118.9, 120.1, 122.4, 124.6, 125.5, 126.7 (2C), 128.8 (2C) (CH), 115.6, 117.4, 126.4, 135.0, 135.3, 167.3 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (250.3): ber. C 76.78, H 5.64, N 11.19, gef. C 76.47, H 5.67, N 11.07; MS: (EI): m/z (%): 250.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokrat.): 100% bei 254 nm und 100% bei 280 nm; t_N = 4.5 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.04 min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 97.1% bei 254 nm; t_N = 11.0 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.18 min; λ_{max} = 237 nm, 267 nm, 313 nm.

3-(3-Methoxyphenyl)-*N*-methyl-1*H*-indol-7-carboxamid (**19e**):

Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56b**, 134 mg, 0.50 mmol), Methylamin in THF ($c = 2.00$ M, 300 μ L, 0.57 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und PyBOP (297 mg, 0.57 mmol). Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC getrennt von Verunreinigungen (ACN/Wasser: 60/40). Es wurden 10 mg (7.14%) des Produktes als gelber Lack isoliert.

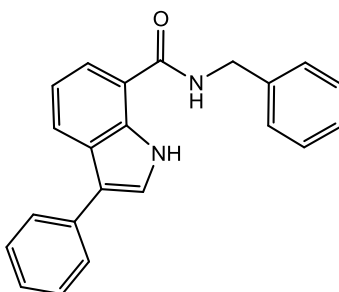
Schmp.: 51-53 °C; IR (KBr): 3415 cm^{-1} , 3059 cm^{-1} , 2935 cm^{-1} , 2832 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.87 (d, 3H, $J = 4.5$ Hz, CH_3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 6.83 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.6 Hz, 8.3 Hz, ArH), 7.12 - 7.22 (m, 2H, ArH), 7.23 - 7.27 (m, 1H, ArH), 7.35 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 7.66 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 8.02 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.56 (q, 1H, $J = 4.5$ Hz, NH-Amid), 11.39 (s, 1H, NH-Indol); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 25.9, 54.9 (CH_3), 111.2, 111.9, 118.9, 119.0, 120.0, 122.3, 124.7, 129.7 (CH), 115.4, 117.4, 126.4, 134.9, 136.6, 159.6, 167.2 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ (280.32); MS: (EI): m/z (%): 280.1 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 280.12063, gef. 280.12066; HPLC (isokr.): 96.1% bei 254 nm, 97.6% bei 280 nm; $t_N = 4.1$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.04$ min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 99.2% bei 254 nm, $t_N = 11.2$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.20$ min; $\lambda_{\text{max}} = 268$ nm.

3-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-methyl-1*H*-indol-7-carboxamid (**19f**):

Nach AAV6 aus 3-(3-Hydroxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56d**, 114 mg, 0.45 mmol), Methylamin in THF ($c = 2.00 \text{ M}$, 260 μL , 0.51 mmol), Diisopropylethylamin (355 μL , 2.07 mmol) und PyBOP (265 mg, 0.51 mmol). Umkristallisation aus Ethanol. Es wurden 30 mg (25.0%) des Produktes als braunes Pulver isoliert.

Schmp.: 244-245°C; IR (KBr): 3451 cm^{-1} , 3389 cm^{-1} (NH), 3124 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.87 (d, 3H, $J = 4.5 \text{ Hz}$, CH_3), 6.66 (ddd, 1H, $J = 1.1 \text{ Hz}$, 2.4 Hz, 8.0 Hz, ArH), 7.08 (m, 2H, ArH), 7.16 (t, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, ArH), 7.23 (t, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, ArH), 7.56 (d, 1H, $J = 2.6 \text{ Hz}$, ArH), 7.59 (d, 1H, $J = 6.7 \text{ Hz}$, ArH), 7.99 (d, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, ArH), 8.56 (q, 1H, $J = 4.5 \text{ Hz}$, Amid-NH), 9.38 (s, 1H, Phenol), 11.32 (d, 1H, $J = 2.7 \text{ Hz}$, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 25.9 (CH_3), 112.6, 113.4, 117.5, 118.8, 120.0, 122.3, 124.3, 129.7 (CH), 115.6, 117.3, 126.4, 134.9, 136.4, 157.6, 167.2 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ (266.3): ber. C 72.16, H 5.30, N 10.52, gef. C 71.77, H 5.39, N 10.04; MS: (EI): m/z (%): 266.1 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 266.10498, gef. 266.10545; HPLC (isokr.): 99.9% bei 254 nm und 100% bei 280 nm; $t_N = 6.3 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.05 \text{ min}$ (ACN/Wasser = 30/70); HPLC (grad.): 94.5% bei 254 nm, $t_N = 9.3 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.20 \text{ min}$; $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$.

N-Benzyl-3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamid (**19g**):

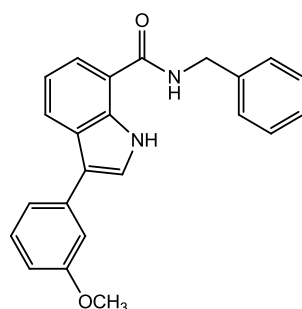


Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 119 mg, 0.50 mmol), Benzylamin (70 μL , 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μL , 2.30 mmol) und PyBOP (295 mg, 0.57 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol 80%. Das Produkt wurde in Form weißer Kristalle erhalten (132 mg, 81%).

Schmp.: 199-201 °C; IR (KBr): 3388 cm^{-1} (NH), 3353 cm^{-1} (NH), 1623 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 4.57 (d, 2H, $J = 5.9 \text{ Hz}$, CH_2), 7.19 (t, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, ArH), 7.22-7.29 (m, 2H, ArH), 7.31-7.47 (m, 6H, ArH), 7.63 (d, 1H, $J = 2.7 \text{ Hz}$, ArH), 7.65-7.72 (m, 2H, ArH), 7.81 (d, 1H, $J = 7.5 \text{ Hz}$, ArH), 8.05 (d, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, ArH), 9.19 (t, 1H, $J = 6.0 \text{ Hz}$, Amid-NH), 11.41 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 42.3 (CH_2); 118.9,

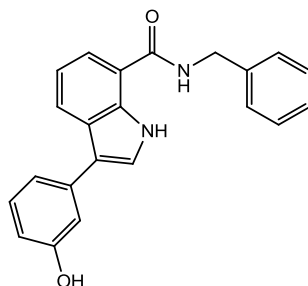
120.3, 122.6, 124.6, 125.5, 126.6, 126.8 (2C), 127.1 (2C), 128.2 (2C), 128.8 (2C) (C); 115.8, 117.0, 126.4, 135.1, 135.2, 139.8, 166.8 (C); $C_{22}H_{18}N_2O$ (326.4): ber. C 80.96, H 5.56, N 8.58, gef. C 80.69, H 5.60, N 8.26; MS: (EI): m/z (%): 326.1 $[M]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.7% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 5.6 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 98.4% bei 254 nm; t_N = 13.1 min, t_M (DMSO) = 1.21 min; λ_{max} = 239 nm, 266 nm, 314 nm.

N-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1H-indol-7-carboxamid (19h):



Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (**56b**, 80 mg, 0.3 mmol), Benzylamin (41 μ L, 0.4 mmol), Diisopropylethylamin (230 μ L, 1.34 mmol) und PyBOP (344 mg, 0.66 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (2+1). Es wurden 59 mg (55.0%) des Produktes als hellgelbes Pulver isoliert.

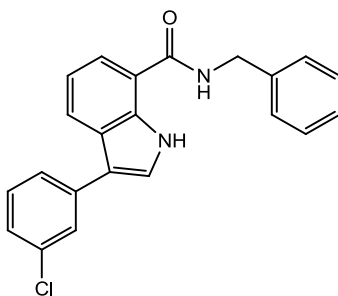
Schmp.: 135-136 °C; IR (KBr): 3399 cm^{-1} (NH), 3351 cm^{-1} (NH), 1622 cm^{-1} (C=O); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 3.83 (s, 3H, CH_3), 4.57 (d, 2H, J = 5.9 Hz, Benzyl- CH_2), 6.83 (ddd, 1H, J = 1.0 Hz, 2.6 Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.14-7.29 (m, 4H, ArH), 7.30-7.42 (m, 5H, ArH), 7.65 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 7.80 (d, 1H, J = 7.5 Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 9.20 (t, 1H, J = 6.1 Hz, Pyrrolidinon-NH), 11.46 (d, 1H, J = 2.8 Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 55.0 (CH_3); 42.4 (CH_2); 111.3, 112.0, 119.0, 119.1, 120.3, 122.7, 124.9, 126.7, 127.2 (2C), 128.3 (2C), 129.8 (CH); 115.6, 117.1, 126.5, 135.2, 136.7, 139.8, 159.7, 166.8 (C); $C_{23}H_{20}N_2O_2$ (356.4); ber. C 77.51, H 5.66, N 7.86; gef. C 77.05, H 5.46, N 8.17; MS (EI): m/z (%) = 356.2 $[M]^+$; HPLC (isokrat.): 100% bei 254 nm und 100% bei 280 nm; t_N = 5.3 min, t_M (DMSO) = 1.05 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90→70/30, linear), 10-13 min (70/30→90/10, linear), 13-20 min (90/10), 98.6% bei 254 nm, t_N = 13.1 min, t_M (DMSO) = 0.94 min; λ_{max} = 267 nm, 310 nm.

***N*-Benzyl-3-(3-hydroxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (19i):**

Nach AAV8 aus *N*-Benzyl-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (**19h**, 57 mg, 0.16 mmol) und Bortribromid gelöst in Dichlormethan ($c = 1 \text{ M}$, 0.7 mL, 0.6 mmol). Es wurden 12 mg (21.9%) des Produkts als weißlich-gelbes Pulver erhalten.

Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 40/60).

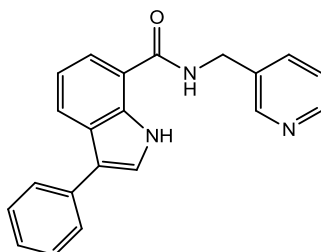
Schmp.: 166-168 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3431 cm^{-1} , 3368 cm^{-1} , 3182 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} (C=O), 1605 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): 4.57 (d, 2H, $J = 5.9 \text{ Hz}$, CH_2), 6.66 (ddd, 1H, $J = 1.1 \text{ Hz}$, 2.3 Hz, 8.1 Hz, ArH), 7.06-7.11 (m, 2H, ArH), 7.16-7.28 (m, 3H, ArH), 7.31-7.41 (m, 4H, ArH), 7.55 (d, 1H, $J = 2.6 \text{ Hz}$, ArH), 7.80 (d, 1H, $J = 7.5 \text{ Hz}$, ArH), 8.01 (d, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, ArH), 9.20 (t, 1H, $J = 6.1 \text{ Hz}$, Amid-NH), 9.38 (s, 1H, Phenol), 11.36 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 42.4 (CH_2), 112.7, 113.5, 117.6, 118.9, 120.3, 122.7, 124.5, 126.7, 127.2 (2C), 128.3 (2C), 129.8 (CH), 115.8, 117.1, 126.6, 135, 2, 136.5, 139.9, 157.7, 166.8 (C); $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ (342.4); MS (EI): m/z (%) 342.2 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 342.13628, gef. 342.13620; HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 99.8% bei 280 nm; $t_N = 4.7 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06 \text{ min}$ (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 98.7% bei 254 nm, $t_N = 11.4 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.23 \text{ min}$; $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$.

***N*-Benzyl-3-(3-chlorphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (19j):**

Nach AAV6 aus 3-(3-Chlorphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56c**, 46 mg, 0.2 mmol), Benzylamin (24 μ L, 0.2 mmol), Diisopropylethylamin (135 μ L, 0.78 mmol) und PyBOP (104 mg, 0.2 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (2+1). Es wurden 47 mg (76.6%) des Produktes als rötliches Pulver isoliert.

Schmp.: 179-181 °C ; IR (KBr): 3383 cm^{-1} (NH), 3346 cm^{-1} (NH), 1622 cm^{-1} (C=O), 1596 cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 4.57 (d, 2H, J = 5.9 Hz, CH_2), 7.19-7.41 (m, 7H, ArH), 7.46 (t, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.65-7.69 (m, 1H, ArH), 7.70 (t, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 7.74 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 7.82 (d, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, J = 8.0, ArH), 9.21 (t, 1H, J = 6.0 Hz, Amid-NH), 11.52 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 42.3 (CH_2); 119.2, 120.5, 122.4, 125.2, 125.2, 125.5, 126.0, 126.7, 127.1 (2C), 128.2 (2C), 130.6 (CH); 114.0, 117.2, 126.1, 133.5, 135.1, 137.5, 139.7, 166.7 (C); $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}$ (360.8); ber. C 73.23, H 4.75, N 7.76, gef. C 73.03, H 4.68, N 7.32; MS: (EI): m/z (%): 360.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.3% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; t_N = 4.3 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.08 min (ACN/Wasser = 70/30); HPLC (grad.): 97.7% bei 254 nm, t_N = 14.0 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.19 min; λ_{max} = 276 nm, 312 nm.

3-Phenyl-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (**19k**):

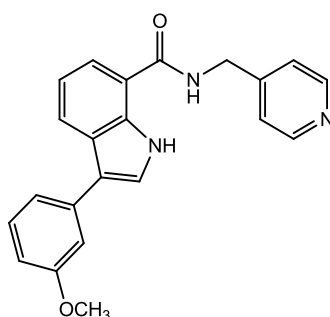


Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 119 mg, 0.50 mmol), 3-Aminomethylpyridin (64 μ L, 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und PyBOP (295 mg, 0.57 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol. Das Produkt wurde in Form eines weißlich-gelben Pulvers erhalten (53 mg, 32.4%).

Schmp.: 176-177 °C; IR (KBr): 3425 cm^{-1} (NH), 3261 cm^{-1} (NH), 3057 cm^{-1} , 3026 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} (C=O), 1599 cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 4.58 (d, 2H, J = 5.8 Hz, CH_2), 7.12-7.30 (m, 2H, ArH), 7.38 (dd, 1H, J = 4.8 Hz, 7.9 Hz, ArH), 7.41-7.49 (m, 2H, ArH), 7.63 (d, 1H, J = 2.6 Hz, ArH), 7.65-7.71 (m, 2H, ArH), 7.75-7.82 (m, 2H, ArH), 8.05 (d, 1H, J = 8.0 Hz, ArH), 8.47 (d, 1H, J = 4.0 Hz, ArH), 8.62 (s, 1H, ArH), 9.24 (t, 1H, J = 5.9 Hz, Amid-NH),

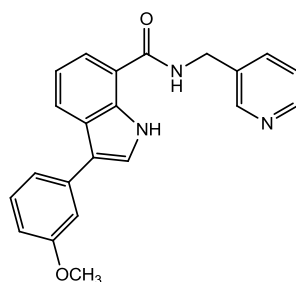
11.40 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 40.1 (CH_2), 118.9, 120.2, 122.8, 123.5, 124.6, 125.5, 126.7 (2C), 128.8 (2C), 135.0, 148.0, 148.8 (CH), 115.6, 116.8, 126.5, 128.1, 135.2, 135.2, 166.9 (C); $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ (327.4): ber. C 77.04, H 5.23, N 12.84, gef. C 76.68, H 5.14, N 12.47; MS (EI): m/z (%): 327.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm; $t_N = 4.9$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 0.99$ min (ACN/Puffer(pH 2.6) = 40/60); $\lambda_{\text{max}} = 241$ nm, 263 nm, 316 nm.

3-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(pyridin-4-ylmethyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (**19l**):



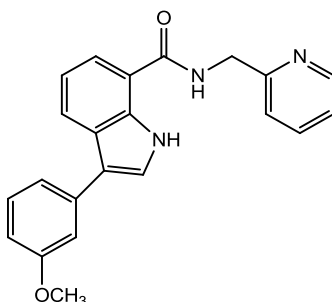
Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56b**, 134 mg, 0.5 mmol), 4-Aminomethylpyridin (65 μL , 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μL , 2.30 mmol) und PyBOP (306 mg, 0.59 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (2+1). Es wurden 56 mg (31.3%) des Produktes in Form weiß-gelber, feiner Kristallnadeln isoliert.

Schmp.: 188-190 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3429 cm^{-1} (NH), 3069 cm^{-1} , 2960 cm^{-1} , 2913 cm^{-1} , 2835 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} (C=O), 1604 cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 3.83 (s, 3H, OCH_3), 4.58 (d, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2), 6.84 (dd, 1H, $J = 2.6$ Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.16-7.30 (m, 3H, ArH), 7.31-7.40 (m, 3H, ArH), 7.65 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, Indol-CH), 7.83 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.49-8.55 (m, 2H, ArH), 9.29 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, Amid-NH), 11.42 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 55.0 (CH_3), 41.6 (CH_2), 111.3, 112.1, 119.0, 119.2, 120.4, 122.1 (2C), 122.9, 124.9, 129.8, 149.5 (2C) (CH), 115.6, 116.8, 126.6, 135.1, 136.6, 148.8, 159.7, 167.1 (C); $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (357.4); ber. C 73.93, H 5.36, N 11.76; gef. C 73.46, H 5.35, N 11.61; MS (EI): m/z (%) = 357.2 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokr.): 98.3% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm; $t_N = 3.2$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 0.98$ min (ACN/Puffer pH 2.6 = 40/60), $\lambda_{\text{max}} = 315$ nm.

3-(3-Methoxyphenyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)-1H-indol-7-carboxamid (**19m**):

Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (**56b**, 134 mg, 0.5 mmol), 3-Aminomethylpyridin (65 μ L, 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und PyBOP (306 mg, 0.59 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (2+1). Es wurden 67 mg (37.5%) des Produktes als hellgelbe Kristalle isoliert.

Schmp.: 184-185 °C; IR (KBr): 3273 cm^{-1} (NH), 1634 cm^{-1} (C=O), 1595 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.58 (d, 2H, J = 5.8 Hz, CH₂), 6.83 (ddd, 1H, J = 1.0 Hz, 2.6 Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.17-7.22 (m, 2H, ArH), 7.25 (dt, 1H, J = 1.2 Hz, 7.8 Hz, ArH), 7.31-7.41 (m, 2H, ArH), 7.65 (d, 1H, J = 2.8 Hz, ArH), 7.74-7.82 (m, 2H, ArH), 8.05 (d, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 8.47 (dd, 1H, J = 1.7 Hz, 4.8 Hz, ArH), 8.62 (d, 1H, J = 1.7 Hz, ArH), 9.25 (t, 1H, J = 5.9 Hz, Amid-NH), 11.42 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 55.0 (CH₃); 40.2 (CH₂); 111.3, 112.0, 119.0, 119.2, 120.4, 122.8, 123.5, 124.9, 129.8, 135.1, 148.0, 148.8 (CH); 115.6, 116.9, 126.5, 135.1, 135.2, 136.6, 159.7, 167.0 (C); C₂₂H₁₉N₃O₂ (357.4); ber. C 73.93, H 5.36, N 11.76; gef. C 73.80, H 5.44, N 11.49; MS (EI): m/z (%) = 357.1 [M]⁺; HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 4.5 min, t_M (DMSO) = 1.00 min (ACN/Puffer pH 2.6 = 40/60); λ_{max} = 263 nm.

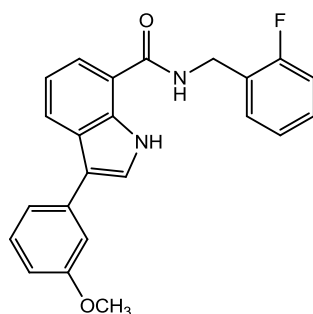
3-(3-Methoxyphenyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)-1H-indol-7-carboxamid (**19n**):

Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (**56b**, 134 mg, 0.5 mmol), 2-Aminomethylpyridin (65 μ L, 0.6 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und

PyBOP (306 mg, 0.59 mmol). Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (2+1). Es wurden 140 mg (78.3%) des Produktes als beige, plättchenförmige Kristalle isoliert.

Schmp.: 152-153 °C; IR (KBr): 3411 cm^{-1} (NH), 3376 cm^{-1} (NH), 1640 cm^{-1} (C=O), 1606 cm^{-1} ; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 3.83 (s, 3H, OCH_3), 4.66 (d, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2), 6.83 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.6 Hz, 8.3 Hz, ArH), 7.16-7.30 (m, 4H, ArH), 7.31-7.43 (m, 2H, ArH), 7.66 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 7.77 (td, 1H, $J = 1.8$ Hz, 7.7 Hz, ArH), 7.84 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 8.06 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 8.50-8.57 (m, 1H, ArH), 9.27 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, Amid-NH), 11.45 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 55.0 (CH_3); 44.5 (CH_2); 111.3, 112.0, 119.0, 119.2, 120.4, 120.9, 122.0, 122.8, 124.9, 129.8, 136.7, 148.8 (CH); 115.6, 117.1, 126.5, 135.1, 136.6, 158.9, 159.7, 167.0 (C); $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ (357.4); ber. C 73.93, H 5.36, N 11.76; gef. C 73.65, H 5.34, N 11.5; MS (EI): m/z (%) = 357.1 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokr.): 99.2% bei 254 nm und 99.3% bei 280 nm; $t_N = 4.3$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.09$ min (ACN/Puffer pH 2.6 = 50/50); $\lambda_{\text{max}} = 264$ nm, 314 nm.

***N*-(2-Fluorbenzyl)-3-(3-methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (19o):**



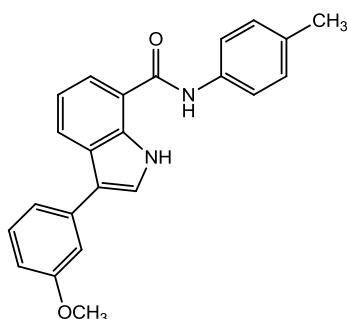
Nach AAV6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56b**, 134 mg, 0.5 mmol), 2-Fluorbenzylamin (72 μL , 0.5 mmol), Diisopropylethylamin (390 μL , 2.30 mmol) und PyBOP (298 mg, 0.57 mmol). Umkristallisation aus Toluol/Hexan (1+1), sowie aus Ethanol. Es wurden 74 mg (39.6%) des Produktes in Form weiß-gelber Kristalle isoliert.

Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 60/40).

Schmp.: 131-136 °C; IR (KBr): 3451 cm^{-1} , 3340 cm^{-1} (NH), 1620 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 3.83 (s, CH_3), 4.61 (d, $J = 5.7$ Hz, CH_2), 6.84 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.6 Hz, 8.2 Hz), 7.12-7.49 (m, 8H, ArH), 7.65 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz), 7.82 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 7.6 Hz, ArH), 8.05 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 9.19 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz, Amid-NH), 11.43 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz, Indol-

NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 55.0 (CH_3); 36.1 (d, $J = 4.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$) (CH_2), 111.3, 112.0, 115.0 (d, $J = 21.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$), 119.0, 119.2, 120.4, 122.8, 124.3 (d, $J = 3.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$), 124.9, 128.7 (d, $J = 8.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$), 129.4 (d, $J = 4.3$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$), 129.8 (CH); 115.6, 116.9, 126.2, 126.3 (d, $J = 14.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$), 135.1, 136.6, 159.7, 159.9 (d, $J = 245.4$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-F}$), 166.9 (C); $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_2$ (374.4); ber. C 73.78, H 5.11, N 7.48; gef. C 73.57, H 5.06, N 7.52; MS (EI): m/z (%) = 374.2 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokrat.): 99.6% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; $t_N = 5.8$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.08$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 98.7% bei 254 nm, $t_N = 13.1$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 266$ nm, 311 nm.

3-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-Methylphenyl)-1*H*-indol-7-carboxamid (**19p**):

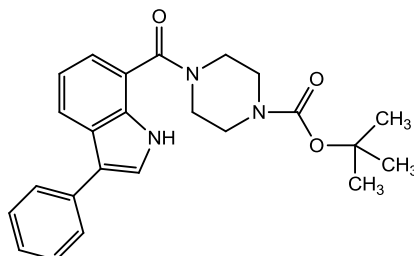


Nach AAV 6 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56b**, 66 mg, 0.3 mmol), 4-Methylphenylamin (31 mg, 0.3 mmol), Diisopropylethylamin (200 μL , 1.15 mmol) und PyBOP (149 mg, 0.3 mmol). Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 50/50). Es wurden 21 mg (23.6%) des Produktes als gelbes Pulver isoliert.

Schmp.: 202-204 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3391 cm^{-1} , 3356 cm^{-1} , 2961 cm^{-1} , 2915 cm^{-1} , 2836 cm^{-1} , 1708 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): 2.30 (s, 3H, CH_3), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 6.84 (ddd, $J = 1.0$ Hz, 2.6 Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.16-7.31 (m, 5H, ArH), 7.32-7.39 (m, 1H, ArH), 7.69 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 7.71-7.77 (m, 2H, ArH), 7.89 (dd, 1H, $J = 0.9$ Hz, 7.6 Hz, ArH), 8.09 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 10.26 (s, 1H, Amid-NH), 11.49 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 20.5, 55.0 (CH_3), 111.4, 112.1, 119.0, 119.2, 120.5 (2C), 121.1, 123.0, 125.0, 129.0 (2C), 129.9 (CH), 115.7, 117.9, 126.6, , 132.5, 135.0, 136.60, 136.61, 159.7, 165.6 (C); $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ (356.4); ber. C 77.51, H 6.66, N 7.86; gef. C 75.63, H 5.57, N 7.82; MS (EI): m/z (%) = 356.2 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 356.15193, gef. 356.1525589; HPLC (isokr.): 96.6% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm; $t_N = 4.0$ min,

$t_M(\text{DMSO}) = 1.07 \text{ min}$ (ACN/Wasser = 70/30); HPLC (grad.): 94.4% bei 254 nm, $t_N = 13.8 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21 \text{ min}$; $\lambda_{\text{max}} = 244 \text{ nm}$, 270 nm, 317 nm.

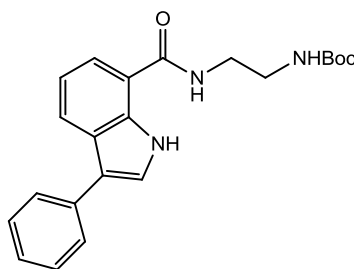
tert-Butyl-4-(3-phenyl-1*H*-indol-7-carbonyl)piperazin-1-carboxylat (**19g**):



Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 150 mg, 0.63 mmol), Boc-Piperazin (144 mg, 0.72 mmol), Diisopropylethylamin (495 μL , 2.90 mmol) und PyBOP (375 mg, 0.72 mmol). Es wurden 190 mg (74.4%) des Produktes als gelbliches Pulver isoliert, welches als Rohprodukt für weitere Reaktionen verwendet wurde.

Schmp.: 174-175 $^{\circ}\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.41 (s, 9H, CH_3), 3.40 (s, 8H, CH_2), 7.11-7.21 (m, 2H, ArH), 7.25 (tt, 1H, $J = 1.1 \text{ Hz}$, 7.4 Hz, ArH), 7.40-7.49 (m, 2H, ArH), 7.66-7.73 (m, 3H, ArH), 7.89-7.98 (m, 1H, ArH), 11.36 (d, 1H, $J = 2.7 \text{ Hz}$, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 28.0 (3C) (CH_3), 119.3, 120.2, 120.5, 124.4, 125.6, 126.7 (2C), 128.8 (2C) (CH), 79.2, 116.1, 119.8, 125.9, 133.2, 135.3, 153.8, 167.5 (C); HPLC (isokr.): 99.4% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm; $t_N = 5.3 \text{ min}$, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06 \text{ min}$ (ACN/Wasser = 60/40).

tert-Butyl-(2-(3-phenyl-1*H*-indol-7-carboxamido)ethyl)carbammat (**19r**):

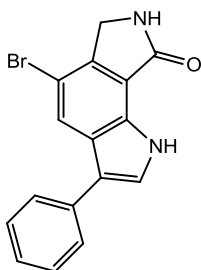


Nach AAV6 aus 3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (**56a**, 119 mg, 0.5 mmol), Ethylendiamin-Boc (91 mg, 0.57 mmol), Diisopropylethylamin (390 μL , 2.30 mmol) und PyBOP (295 mg, 0.57 mmol). Es wurden 51 mg (26.9%) des Produktes als gelb-bräunlichen Pulver isoliert, welches als Rohprodukt für weitere Reaktionen verwendet wurde.

Die Signale der CH₂-Gruppen der Ethylenteilstruktur liegen im ¹³C-NMR-Spektrum unter dem DMSO-Peak.

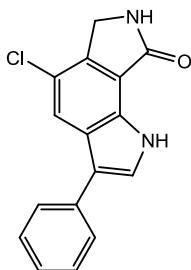
¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm)= 1.38 (s, 9H, CH₃), 3.17 (q, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂), 3.38 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz, CH₂), 6.98 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH), 7.17 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, ArH), 7.26 (tt, 1H, *J* = 7.4 Hz, 1.2 Hz, ArH), 7.41-7.48 (m, 2H, ArH), 7.64 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, ArH), 7.72-7.66 (m, 3H, ArH), 8.03 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 8.59 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH-Amid), 11.36 (s, 1H, NH-Indol); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 101 MHz): δ (ppm)= 28.1 (3C) (CH₃), 118.8, 120.3, 122.4, 124.5, 125.5, 126.7 (2C), 128.7 (2C) (CH), 115.5, 117.3, 126.3, 128.8, 135.0, 135.2, 155.7, 166.9 (C).

5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**21a**):



Nach AAV3 aus Phenylacetaldehyddimethylacetal (500 µL, 3.00 mmol), 2-(7-Brom-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25c**, 836 mg, 3.00 mmol) und Natriumacetat (246 mg, 3.0 mmol). Es wurden 270 mg (28%) des Produktes als gelber Feststoff erhalten.

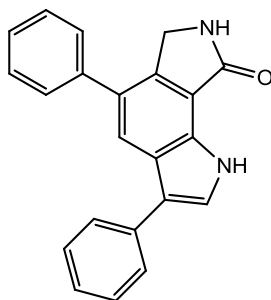
Schmp.: 226-227 °C; IR (KBr): 3449 cm⁻¹, 3424 cm⁻¹ (NH), 3192 cm⁻¹, 3075 cm⁻¹, 2902 cm⁻¹, 1708 cm⁻¹, 1674 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): 4.39 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.34 (m, 1H, ArH), 7.41-7.51 (m, 2H, ArH), 7.65-7.73 (m, 3H, ArH), 8.18 (s, 1H, ArH), 8.74 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 12.04 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 101 MHz): δ (ppm)= 46.4 (CH₂); 124.6, 125.5, 126.0, 126.9 (2C), 128.9 (2C) (CH); 107.4, 116.0, 118.3, 127.6, 130.1, 134.5, 138.3, 169.5 (C); C₁₆H₁₁BrN₂O (327.2); ber. C 58.74, H 3.39, N 8.56; gef. C 58.42, H 3.47, N 8.20; MS (EI): *m/z* (%) = 326.0 [M]⁺; HPLC (isokr.): 98.0% bei 254 nm und 95.7% bei 280 nm; *t*_N = 4.5 min, *t*_M = 1.08 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 99.0% bei 254 nm, *t*_N = 12.4 min, *t*_M(DMSO) = 1.17 min; λ_{max} = 244 nm, 316 nm.

5-Chlor-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**21b**):

Nach AAV3 aus Phenylacetaldehyddimethylacetal (415 μ L, 2.50 mmol), 2-(7-Chlor-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25d**, 585 mg, 2.50 mmol) und Natriumacetat (205 mg, 2.5 mmol). Es wurden 101 mg (15%) des Produktes als weißer Feststoff erhalten.

Um eine HPLC-Reinheit größer 95.0% zu erreichen, wurde zusätzlich aus Toluol/Hexan (2+1) umkristallisiert und eine Reinigung mittels präparativer HPLC durchgeführt (ACN/Wasser = 50/50).

Schmp.: 208-210 °C; IR (KBr): 3450 cm^{-1} (NH), 3196 cm^{-1} , 3078 cm^{-1} , 2904 cm^{-1} , 1712 cm^{-1} (C=O), 1676 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 4.45 (s, 2H, CH_2), 7.28 (tt, 1H, J = 1.0 Hz, 7.4 Hz, ArH), 7.46 (tt, 2H, J = 1.9 Hz, 7.6 Hz, ArH), 7.65-7.73 (m, 3H, ArH), 8.04 (s, 1H, ArH), 8.71 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 12.01 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 44.8 (CH_2); 121.7, 125.6, 126.0, 126.9 (2C), 128.9 (2 C) (CH), 116.2, 118.1, 119.3, 127.05, 129.7, 134.5, 136.4, 169.4 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ (282.7); ber. C 67.97, H 3.92, N 9.91; gef. C 66.88, H 4.07, N 9.54; MS (EI): m/z (%) = 282.1 $[\text{M}]^+$; HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 282.05544, gef. 282.05576; HPLC (isokr.): 99.5% bei 254 nm und 99.5% bei 280 nm; t_N = 7.3 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.06 min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 99.6 bei 254 nm, t_N = 12.7 min; λ_{max} = 243 nm, 316 nm.

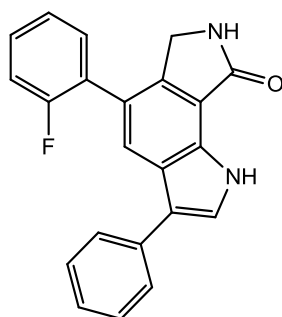
3,5-Diphenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**21c**):

Nach AAV5 aus 5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**21a**, 82 mg, 0.3 mmol), Phenylboronsäure (46 mg, 0.4 mmol), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (3 mg, 2 μ mol) und Cäsiumcarbonat (245 mg, 0.75 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Triethylamin/Toluol/Aceton (0.25/4/0.75) als Elutionsmittel. Es wurden 18 mg (22.2%) eines weiß-gelblichen Pulvers erhalten.

Zum Erreichen einer Reinheit $\geq 95\%$ wurde zusätzlich eine Abtrennung von Verunreinigungen mittels präparativer HPLC durchgeführt (ACN/H₂O = 60/40).

Schmp.: 262-263 °C; IR (KBr): 3417 cm^{-1} (NH), 3188 cm^{-1} , 3079 cm^{-1} , 1688 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ (ppm)= 4.56 (s, 2H, CH₂), 7.27 (tt, 1H, *J* = 1.2 Hz, 7.3 Hz, ArH), 7.39 (tt, 1H, *J* = 1.2 Hz, 7.4 Hz, ArH), 7.43-7.52 (m, 4H, ArH), 7.63-7.66 (m, 2H, ArH), 7.67 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, ArH), 7.71-7.77 (m, 2H, ArH), 8.02 (s, 1H, ArH), 8.58 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.85 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm)= 45.6 (CH₂); 122.3, 124.6, 125.6, 126.9 (2C), 127.0, 128.2 (2C), 128.7 (2C), 128.8 (2C) (CH); 116.5, 116.9, 126.1, 128.8, 130.4, 135.0, 137.2, 139.8, 170.2 (C); C₂₂H₁₆N₂O (324.4); ber. C 81.46, H 4.97, N 8.64; gef. C 80.23, H 4.80, N 8.14; MS (EI): *m/z* (%) = 324.1 [M]⁺, HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 324.12571, gef. 324.12541; HPLC (isokrat. vor präp. HPLC): 85.0% bei 254 nm und 87.1% bei 280 nm; *t*_N = 5.3 min, *t*_M(DMSO) = 1.09 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 99.0% bei 254 nm, *t*_N = 13.2 min, *t*_M(DMSO) = 1.19 min; λ_{max} = 255 nm, 319 nm.

5-(2-Fluorphenyl)-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on(**21d**):

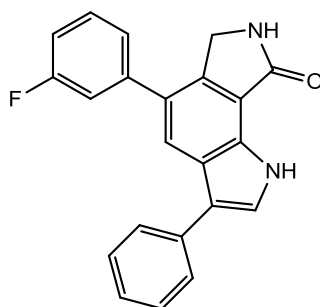


Nach AAV5 aus 5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**21a**, 196 mg, 0.60 mmol), Tetrakis-triphenylphosphinpalladium(0) (28 mg, 2.4 μ mol), Cs₂CO₃ (586 mg, 1.80 mmol) und 2-Fluorboronsäure (126 mg, 0.90 mmol). Es wurden 11 mg (5.4%) des Produktes als gelbes Pulver erhalten.

Zum Erreichen einer Reinheit $\geq 95\%$ wurde zusätzlich eine Abtrennung von Verunreinigungen mittels präparativer HPLC durchgeführt (ACN/H₂O = 60/40).

Schmp.: 136 - 139 °C; IR (KBr): 3417 cm⁻¹ (NH), 3262 cm⁻¹ (NH), 2922 cm⁻¹, 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm)= 4.36 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.28 (m, 1H, ArH), 7.30-7.39 (m, 2H, ArH), 7.41-7.51 (m, 3H, ArH), 7.61 (td, 1H, J = 1.8 Hz, 7.7 Hz, ArH), 7.70 (d, 1H, J = 2.6 Hz, ArH), 7.70-7.74 (m, 2H, ArH), 7.99 (s, 1H, ArH), 8.55 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.93 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 151 MHz): δ (ppm)= 45.2 (d, ⁵J_{C,F} = 4.5 Hz, C-C-C-C-C-F) (CH₂); 115.8 (d, ²J_{C,F} = 22.4 Hz, C-C-F), 123.7, 124.7 (d, ⁴J_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-C-C-F), 124.8, 125.7, 126.9 (2C), 128.8 (2C), 129.6 (d, ³J_{C,F} = 8.1 Hz, C-C-C-F), 131.7 (d, ⁴J_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-C-C-F) (CH); 116.5, 116.7, 122.5, 125.8, 126.8 (d, ²J_{C,F} = 15.5 Hz, C-C-F), 130.6, 134.9, 138.1, 159.1 (d, ¹J_{C,F} = 244.0 Hz, C-F), 170.1 (C); C₂₂H₁₅FN₂O (342.4); ber. C 77.18, H 4.42, N 8.18; gef. C 76.22, H 4.31, N 7.51; MS (EI): m/z (%) = 342.1 [M]⁺, HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 342.11629, gef. 342.11663; HPLC (isokr.): 98.9% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm; t_N = 4.4 min, t_M(DMSO) = 1.05 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-2 min (10/90), 2-12 min (10/90→90/10, linear), 12-20 min (90/10), 96.7% bei 254 nm, t_N = 13.0 min, t_M(DMSO) = 1.23 min; λ_{max} = 248 nm, 315 nm.

5-(3-Fluorphenyl)-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on(21e):

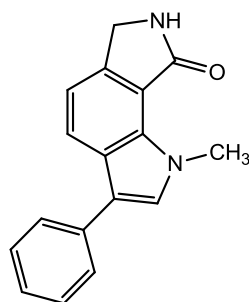


Nach AAV5 aus 5-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1H)-on (**21a**) (98 mg, 0.30 mmol), Tetrakis-triphenylphosphin palladium(0) (14 mg, 1.2 μ mol), Cs₂CO₃ (293 mg, 0.90 mmol) und 3-Fluorboronsäure (63 mg, 0.3 mmol). Es wurden 32 mg (31.2%) des Produktes als graues Pulver erhalten.

Schmp.: 246-247 °C; IR (KBr): 3416 cm⁻¹ (NH), 3189 cm⁻¹ (CH, aromatisch), 3077 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 2922 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ (ppm)= 4.48 (s, 2H, CH₂), 7.19-7.24 (m, 1H, ArH), 7.27 (tt, 1H, J = 1.2 Hz, 7.4 Hz, ArH), 7.42-7.47 (m, 2H, ArH),

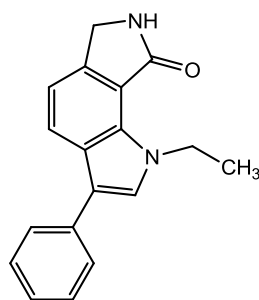
7.48-7.55 (m, 3H, ArH), 7.68 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.73-7.78 (m, 2H, ArH), 8.05 (s, 1H, ArH), 8.61 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.89 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 45.5 (CH_2); 113.7 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 20.8$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$), 115.0 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 21.5$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-F}$), 122.5, 124.5 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 2.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$), 124.8, 125.7, 126.9 (2C), 128.8 (2C), 130.6 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 8.7$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$) (CH), 116.7, 117.0, 126.0, 127.4 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 1.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$), 130.6, 135.0, 137.2, 142.2 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 8.0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-C-C-F}$), 162.4 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 243.6$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-F}$), 170.10 (C); $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}$ (342.4); ber. C 77.18, H 4.42, N 8.18; gef. C 76.34, H 4.43, N 7.98; MS (EI): m/z (%) = 342.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 342.11629, gef. 342.11679; HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 99.4% bei 280 nm; $t_N = 5.2$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40, HPLC (grad.): 98.3% bei 254 nm, $t_N = 13.2$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.20$ min; $\lambda_{\text{max}} = 259$ nm, 318 nm.

1-Methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (22a):



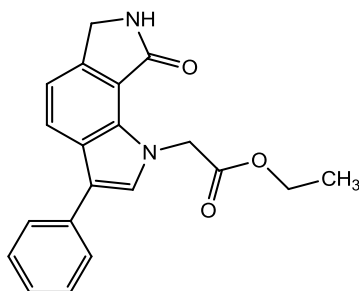
Nach AAV7 aus 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 161 mg, 0.65 mmol), Kalium-*tert*-butylat (73 mg, 0.7 mmol) und Iodmethan (405 μL , 6.50 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (8/1/0.5) als Elutionsmittel. Umkristallisation aus Ethanol (96%). Das Produkt wurde in Form gelblich weißer Nadeln in einer Menge von 75 mg (44.0%) isoliert.

Schmp.: 255-256 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3208 cm^{-1} (NH), 3082 cm^{-1} (CH, aromatisch), 1686 cm^{-1} (C=O), 1639 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} (C=C, Aromat); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 4.40 (s, 3H, CH_3), 4.46 (s, 2H, CH_2), 7.28 (m, 2H, ArH), 7.45 (m, 2H, ArH), 7.64 (m, 3H, ArH), 8.04 (m, 1H, ArH), 8.51 (s, 1H, Pyrrolinon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 37.7 (CH_3); 45.3 (CH_2); 114.8, 123.0, 125.8, 127.0, 128.8, 129.0 (CH); 116.6, 117.1, 126.3, 132.8, 134.8, 141.3, 170.1 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$ (262.3); ber. C 77.84, H 5.38, N 10.68; gef. C 77.47, H 5.42, N 10.59; MS (EI): m/z (%) = 262.1 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokr.): 99.5% bei 254 nm und 99.6% bei 280 nm; $t_N = 3.8$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 96.1% bei 254 nm, $t_N = 12.5$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.18$ min; $\lambda_{\text{max}} = 246$ nm, 269 nm, 316 nm.

1-Ethyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**22b**):

Nach AAV7 aus 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 248 mg, 1.00 mmol), Kalium-*tert*-butylat (112 mg, 1.00 mmol) und Iodethan (805 μ L, 10.0 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (8/1/0.5) als Elutionsmittel. Die Umkristallisation wurde aus Toluol/Hexan (2+1) durchgeführt. Das Produkt wurde in Form gelber Nadeln in einer Menge von 132 mg (47.8%) isoliert.

Schmp.: 198-200 °C; IR (KBr): 3189 cm^{-1} (NH), 3073 cm^{-1} , 2958 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} , 2859 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): 1.37 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, Ethyl- CH_3), 4.46 (s, 2H, CH_2), 5.00 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, Ethyl- CH_2), 7.22-7.33 (m, 2H, ArH), 7.41-7.51 (m, 2H, ArH), 7.61-7.69 (m, 2H, ArH), 7.72 (s, 1H, ArH), 8.05 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.51 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 17.2 (CH_3); 44.6, 45.3 (CH_2); 114.8, 123.1, 125.8, 127.1 (2C), 127.5, 128.8 (2C) (CH); 116.9, 116.9, 126.3, 131.8, 134.8, 141.3, 170.1 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (276.3); ber. C 78.24, H 5.84, N 10.14; gef. C 78.27, H 5.68, N 9.99; MS (EI): m/z (%) = 276.1 $[\text{M}]^+$; HPLC (isokr.): 99.1% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm; $t_N = 4.6$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.05$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 97.2% bei 254 nm, $t_N = 12.9$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21$ min; $\lambda_{\text{max}} = 246$ nm, 269 nm, 316 nm.

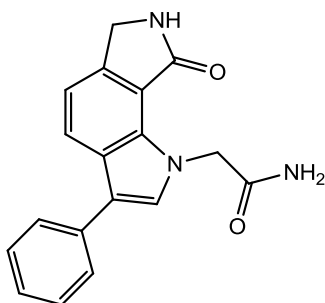
Ethyl-2-(8-oxo-3-phenyl-7,8-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-1(6*H*)-yl)acetat (**22c**):

Nach AAV7 aus 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 198 mg, 0.80 mmol), Kalium-*tert*-butylat (90 mg, 0.8 mmol) und Bromessigsäureethylester (855 μ L, 8.00 mmol).

Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (8/1/0.5) als Elutionsmittel. Die Umkristallisation erfolgte aus Toluol/Hexan (3+1). Das Produkt wurde in Form eines gelben Pulvers in einer Menge von 69 mg (25.8%) isoliert.

Schmp.: 226-227 °C; IR (KBr): 3234 cm^{-1} (NH), 1739 cm^{-1} (C=O), 1672 cm^{-1} (C=O), 1634 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 1.21 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 4.13 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, Ethyl- CH_2), 4.46 (s, 2H, Pyrrolidinon- CH_2), 5.80 (s, 2H, CH_2), 7.24-7.36 (m, 2H, ArH), 7.42-7.52 (m, 2H, ArH), 7.60-7.70 (m, 3H, ArH), 8.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.52 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 14.1 (CH_3); 45.5, 51.5, 60.5 (CH_2); 115.2, 123.1, 126.0, 127.0 (2C), 128.7 (2C), 128.9 (CH); 117.1, 117.2, 126.4, 133.0, 134.5, 141.2, 169.6, 170.2 (C); $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ (334.4); ber. C 71.84, H 5.43, N 8.38; gef. C 71.21, H 5.25, N 8.20; MS (EI): m/z (%) = 334.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 334.13119, gef. 334.13053; HPLC (isokr.): 98.0% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm; $t_N = 3.1$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-13 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 13-20 min (90/10), 96.6% bei 254 nm, $t_N = 11.3$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.21$ min; $\lambda_{\text{max}} = 244$ nm, 311 nm.

2-(8-Oxo-3-phenyl-7,8-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-1(6*H*)-yl)acetamid (**22d**):

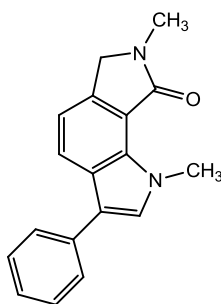


Nach AAV7 aus 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 186 mg, 0.75 mmol), Kalium-*tert*-butylat (96 mg, 0.8 mmol) und Bromacetamid (1.04 g, 7.50 mmol). Filtration über eine mit Kieselgel gefüllte Fritte (Schichtdicke: 3 cm), wobei das Produkt mit Ethanol (96%) eluiert wurde. Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol (80%). Das Produkt wurde in Form eines hellgelben Pulvers in einer Menge von 35 mg (15.3%) isoliert.

Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 30/70).

Schmp.: 284-285 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3309 cm^{-1} (NH), 2991 cm^{-1} , 1703 cm^{-1} (C=O), 1680 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): 4.46 (s, 2H, Pyrrolidinon- CH_2), 5.73 (s, 2H, CH_2), 7.04 (s, 1H, Amid-NH), 7.25-7.32 (m, 2H, ArH), 7.42 (s, 1H, Amid-NH), 7.44-7.50 (m, 2H, ArH), 7.57 (s, 1H, ArH), 7.63-7.68 (m, 2H, ArH), 8.06 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 8.52 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 45.4, 52.2 (CH_2); 114.8, 123.0, 125.8, 126.9 (2C), 128.8 (2C), 129.0 (CH); 116.8, 117.0, 126.1, 133.4, 134.7, 141.1, 170.2, 170.3 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (305.3); ber. C 70.81, H 4.95, N 13.76; gef. C 69.23, H 4.72, N 13.15; MS (EI): m/z (%) = 305.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 305.11588, gef. 305.11515; HPLC (isokr., vor präp. HPLC): 91.1% bei 254 nm und 93.3% bei 280 nm; $t_N = 11.5$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.08$ min (ACN/Wasser = 25/75); HPLC (grad., nach präp. HPLC): 98.2% bei 254 nm, $t_N = 9.4$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 248$ nm, 315 nm.

1,7-Dimethyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**22e**):



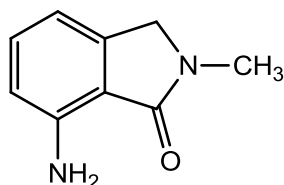
Nach AAV7 aus 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 124 mg, 0.50 mmol), Kalium-*tert*-butylat (73 mg, 0.7 mmol) und Iodmethan (315 μL , 5.00 mmol). Abweichend von AAV7 wurde die Reaktion in getrocknetem THF (10 mL) durchgeführt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung von Ethylacetat/Cyclohexan (3/1) als Elutionsmittel. Das Produkt wurde in Form eines gelben Pulvers in einer Menge von 36 mg (27.4%) isoliert.

Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 60/40).

Schmp.: 151-152 °C; IR (KBr): 3426 cm^{-1} (NH), 3058 cm^{-1} , 2910 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 3,12 (s, 3H, CH_3), 4,40 (s, 3H, CH_3), 4,54 (s, 2H, CH_2), 7,28 (m, 2H, ArH), 7,46 (m, 2H, ArH), 7,65 (m, 3H, ArH), 8,04 (d, 1H, $J = 8.3$, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 29.1, 37.6 (CH_3); 51.7 (CH_2); 114.4, 122.7, 125.8, 127.0 (2C), 128.8 (2C), 129.1 (CH); 116.6, 116.9, 126.5, 132.4, 134.7, 138.5, 167.2 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ (276.3);

ber. C 78.24, H 5.84, N 10.14; gef. C 77.43, H 5.68, N 9.83; MS (EI): m/z (%) = 276.1 $[M]^+$, HRMS (EI): m/z $[M]^+$ ber. 276.12571, gef. 276.12532; HPLC (isokrat., vor präp. HPLC): 87.1% bei 254 nm und 84.0% bei 280 nm; t_N = 3.2 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad., nach präp HPLC): 97.8% bei 254 nm, t_N = 13.3 min, t_M (DMSO) = 1.18 min; λ_{max} = 246 nm, 318 nm.

7-Amino-2-methylisoindolin-1-on (23b):

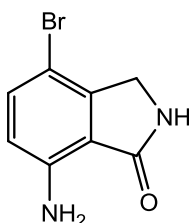


Nach AAV7 aus 7-Aminoisoindolin-1-on (296 mg, 2.0 mmol), Kalium-*tert*-butylat (224 mg, 2.00 mmol) und Iodmethan (1244 μ L, 20.00 mmol). Abweichend von AAV7 wurde die Reaktion in getrocknetem THF (20 mL) durchgeführt. Säulenchromatographische Reinigung unter Verwendung von Ethylacetat als Elutionsmittel. Das Produkt wurde in Form eines gelben Pulvers in einer Menge von 44 mg (55.3%) isoliert.

Schmp.: 126-128 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.98 (s, 3H, CH_3), 4.30 (s, 2H, CH_2), 6.01 (s, 2H, Amin-NH), 6.54 (dd, 1H, J = 0.8 Hz, 8.0 Hz, ArH), 6.61 (dd, 1H, J = 0.9 Hz, 7.4 Hz, ArH), 7.17 (dd, 1H, J = 7.3 Hz, 8.1 Hz, ArH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 28.4 (CH_3), 51.2 (CH_2); 109.6, 112.5, 132.1 (CH); 114.0, 142.7, 146.3, 169.4 (C); $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (162.2); ber. C 66.65, H 6.21, N 17.72; gef. C 66.37, H 6.32, N 17.07; HPLC (grad.): 97.4% bei 254 nm, t_N = 7.58 min.

Lit.¹¹⁵

7-Amino-4-bromisoindolin-1-on (23c):



7-Aminoisoindolinon (148 mg, 1.00 mmol) wird in Dichlormethan (8 mL) suspendiert und auf -8 bis -10 °C gekühlt. *N*-Bromsuccinimid (178 mg, 1.00 mmol) wird hinzugefügt und die

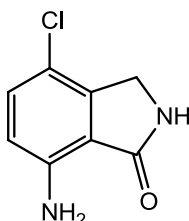
Mischung bei gleichbleibender Temperatur 1 h gerührt. Dann wird eine wässrige Natriumthiosulfat-Lösung (10%, 2.3 mL) hinzugefügt und für weitere 20 min gerührt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan (2 x 10 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen zuerst mit Wasser (3 x 10 mL), dann mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingengt.

Es wurden 177 mg (78%) des Produkts als hellbraune Kristalle erhalten. Ohne weitere Reinigung wurde das Produkt für die nächsten Syntheseschritte eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.14 (s, 1H, CH_2), 6.20 (s, 2H, Amin-NH), 6.55 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.32 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 8.38 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 45.4 (CH_2); 115.0, 134.9 (CH); 100.4, 115.8, 144.5, 146.4, 171.5 (C); $\text{C}_8\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}$ (227.1).

Lit.¹¹⁶

7-Amino-4-chlorisoindolin-1-on (23d):

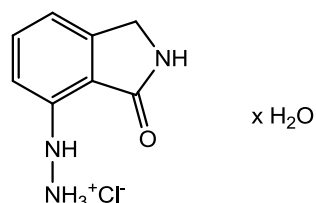


7-Aminoisoindolinon (148 mg, 1.00 mmol) wird in Acetonitril (20 mL) gelöst und auf 60 °C erwärmt. Es wird *N*-Chlorsuccinimid (147 mg, 1.10 mmol) hinzugefügt und das Gemisch langsam zum Reflux erhitzt. Nach 3 h wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und Ethylacetat (30 mL) hinzugefügt. Das Gemisch wird mit Natriumhydroxid-Lösung (5%, 2 x 40 mL) und Wasser (1 x 30 mL) extrahiert, die wässrige Phase wird mit Ethylacetat (2 x 50 mL) extrahiert und mit Wasser (50 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingengt.

Es wurden 145 mg (79.4%) des Rohprodukts als gelb-braunes Pulver erhalten. Ohne weitere Reinigung wurde dieses so erhaltene Rohprodukt für die nächsten Syntheseschritte eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.21 (s, 2H, Pyrrolidinon- CH_2), 6.16 (s, 2H, NH_2), 6.59 (d, 1H, $J = 8.63$ Hz, ArH), 7.21 (d, 1H, $J = 8.55$ Hz, ArH), 8.38 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 43.8 (CH_2), 114.5, 132.1 (CH), 112.8, 115.3, 142.3, 145.9, 171.4 (C); $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}$ (182.6).

2-(3-Oxoisoindolin-4-yl)hydrazin-Hydrochlorid-Monohydrat (**25a**):

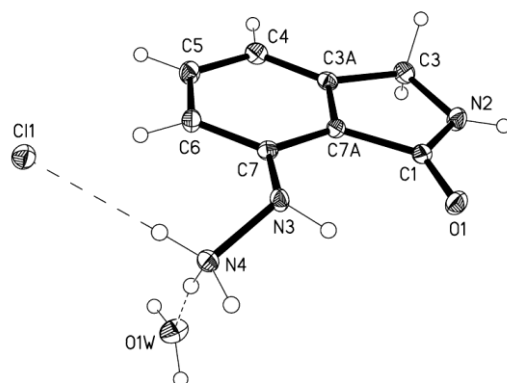


Nach AAV1 aus 7-Aminoisoindolin-1-on (**23a**, 296 mg, 2.00 mmol), Natriumnitrit (166 mg, 2.20 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (1354 mg, 6.00 mmol). Für weitere Syntheseschritte wurde das Rohprodukt verwendet.

Schmp.: 245-246 °C (unter Zersetzung); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.44 (s, 2H, CH_2), 7.03-7.10 (m, 1H, ArH), 7.10-7.17 (m, 1H, ArH), 7.46-7.56 (m, 1H, ArH), 8.54 (s, 1H, Pyrrolinon-NH), 9.03 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 3H, NH_3^+); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 45.8 (CH_2); 113.3, 116.5, 133.0 (CH); 117.6, 143.7, 146.1, 171.2 (C); $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O} \times \text{H}_2\text{O}$ (217.7); ber. C 44.13, H 5.56, N 19.31; gef. C 44.30, H 5.56, N 19.51.

Um eine ausreichende Reinheit für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten, wurde das Rohprodukt in Wasser (40 mL) suspendiert und für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Niederschlag durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt. Der Überstand wurde unter Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand aus Ethanol 96% umkristallisiert. Es wurden 151 mg (38%) des Produktes als gelblich-braune Kristalle erhalten.

Lit.⁴⁸

**Abbildung 56:** Röntgenkristallstruktur von Verbindung **25a**.**Tabelle 14:** Kristalldaten und statistische Parameter

Summenformel	$C_8H_{12}ClN_3O_2$
M_r	217.66 g/mol
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	triklin
Raumgruppe	$P(-1)$
Elementarzelle	$a = 7.2163(6)$ Å, $b = 7.6524(6)$ Å, $c = 9.6768(7)$ Å;
	$\alpha = 105.045(6)^\circ$, $\beta = 93.750(6)^\circ$, $\gamma = 107.054(7)^\circ$
Volumen	$487.53(7)$ Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	1.483 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	0.370 mm ⁻¹
Strukturfaktor F (000)	228
Kristallgröße	$0.30 \times 0.30 \times 0.12$ mm ³
Θ -Bereich für die Datensammlung	$2.21 - 30.91^\circ$
Limitierende Indices (hkl)	$-10 \leq h \leq 10$, $-10 \leq k \leq 10$, $-13 \leq l \leq 13$
Anzahl aufgenommener Reflexionen	23313
Anzahl unabhängiger Reflexionen	2904 [$R(\text{int}) = 0.0282$]
Vollständigkeit der Reflexionen bis $\Theta = 30.00^\circ$	98.7%

Absorptionskorrektur	Semi-empirisch von Äquivalenten
maximale und minimale Transmission	1.00000 und 0.97385
<i>Refinement</i> -Methode	<i>Full-matrix least-squares on F²</i>
Daten/Einschränkungen/Parameter	2904 / 0 / 155
<i>Goodness-of-fit on F²</i>	1.054
Finale R Indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	R1 = 0.0267, wR2 = 0.0674
R Indices (alle Daten)	R1 = 0.0297, wR2 = 0.0690
Größte Differenzpeaks	0.430 and -0.286 e.Å ⁻³

Tabelle 15: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).^{a, b}

	x	y	z	U(eq)
O(1)	8446.6(11)	9804.1(11)	6200.3(8)	16.6(2)
C(1)	6657.7(14)	8928.0(13)	5971.3(10)	12.4(2)
N(2)	5347.9(13)	9281.8(13)	6843.1(10)	15.3(2)
N(3)	8233.6(12)	6972.1(12)	3419.3(9)	11.7(2)
C(3)	3337.6(15)	8040.9(14)	6270.7(11)	14.5(2)
C(3A)	3568.1(14)	6821.4(14)	4839.1(10)	11.6(2)
N(4)	8807.1(13)	6899.2(12)	2011.5(9)	12.3(2)
C(4)	2176.0(14)	5402.9(14)	3750.5(11)	14.1(2)
C(5)	2824.8(14)	4552.6(14)	2506.6(11)	14.4(2)
C(6)	4807.2(14)	5076.2(14)	2346.6(10)	12.8(2)
C(7)	6203.8(13)	6482.1(13)	3451.9(10)	10.4(2)
C(7A)	5541.3(14)	7349.1(13)	4688.4(10)	10.5(2)
Cl(1)	7848.5(3)	2591.7(3)	26.0(2)	13.5(1)
O(1W)	6773.3(12)	8684.2(12)	737.7(9)	19.2(2)

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

^b $U_{\text{(eq)}}$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors.

Tabelle 16: Bindungslängen [Å].^a

O(1)-C(1)	1.2421(12)	C(3A)-C(4)	1.3876(14)
C(1)-N(2)	1.3469(13)	C(3A)-C(7A)	1.3901(13)
C(1)-C(7A)	1.4730(13)	C(4)-C(5)	1.3918(14)
N(2)-C(3)	1.4584(13)	C(5)-C(6)	1.3986(13)
N(3)-C(7)	1.4061(12)	C(6)-C(7)	1.3938(13)
N(3)-N(4)	1.4416(11)	C(7)-C(7A)	1.3961(13)
C(3)-C(3A)	1.5059(13)		

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 17: Bindungswinkel [°].^a

O(1)-C(1)-N(2)	126.21(9)	C(4)-C(5)-C(6)	121.94(9)
O(1)-C(1)-C(7A)	127.24(9)	C(7)-C(6)-C(5)	120.17(9)
N(2)-C(1)-C(7A)	106.53(8)	C(6)-C(7)-C(7A)	117.64(9)
C(1)-N(2)-C(3)	113.76(8)	C(6)-C(7)-N(3)	123.34(9)
C(7)-N(3)-N(4)	115.43(8)	C(7A)-C(7)-N(3)	118.89(8)
N(2)-C(3)-C(3A)	102.10(8)	C(3A)-C(7A)-C(7)	121.84(9)
C(4)-C(3A)-C(7A)	120.71(9)	C(3A)-C(7A)-C(1)	108.86(8)
C(7A)-C(3A)-C(3)	108.74(8)	C(7)-C(7A)-C(1)	129.26(9)
C(3A)-C(4)-C(5)	117.68(9)		

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 18: Torsionswinkel [°].^a

O(1)-C(1)-N(2)-C(3)	178.70(9)	C(4)-C(3A)-C(7A)-C(7)	-0.19(14)
C(7A)-C(1)-N(2)-C(3)	0.31(11)	C(3)-C(3A)-C(7A)-C(7)	-178.99(9)
C(1)-N(2)-C(3)-C(3A)	-0.96(11)	C(4)-C(3A)-C(7A)-C(1)	177.65(9)
N(2)-C(3)-C(3A)-C(4)	-177.38(10)	C(3)-C(3A)-C(7A)-C(1)	-1.16(11)
N(2)-C(3)-C(3A)-C(7A)	1.26(10)	C(6)-C(7)-C(7A)-C(3A)	1.11(14)
C(7A)-C(3A)-C(4)-C(5)	-0.71(14)	N(3)-C(7)-C(7A)-C(3A)	-174.82(8)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(5)	177.80(10)	C(6)-C(7)-C(7A)-C(1)	-176.25(9)
C(3A)-C(4)-C(5)-C(6)	0.69(15)	N(3)-C(7)-C(7A)-C(1)	7.82(15)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0.24(15)	O(1)-C(1)-C(7A)-C(3A)	-177.81(10)
C(5)-C(6)-C(7)-C(7A)	-1.12(14)	N(2)-C(1)-C(7A)-C(3A)	0.55(11)
C(5)-C(6)-C(7)-N(3)	174.62(9)	O(1)-C(1)-C(7A)-C(7)	-0.18(17)
N(4)-N(3)-C(7)-C(6)	35.69(13)	N(2)-C(1)-C(7A)-C(7)	178.18(10)
N(4)-N(3)-C(7)-C(7A)	-148.63(9)		

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.**Tabelle 19:** Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °]; D = Donator, A = Akzeptor, H = Wasserstoff.^a

D-H...A		$\Delta(\text{D-H})$	$\Delta(\text{H...A})$	$\Delta(\text{D...A})$	$\angle(\text{DHA})$
N(2)-H(02)...	#1	0.837(18)	2.630(18)	3.4206(10)	158.0(15)
N(2)-H(02)...	#2	0.837(18)	2.623(18)	3.1969(12)	126.9(14)
N(3)-H(03)...	#3	0.875(15)	2.164(15)	2.8121(11)	130.5(13)
N(3)-H(03)...		0.875(15)	2.287(15)	2.9471(11)	132.3(13)
N(4)-H(04A)...		0.917(16)	2.289(16)	3.1994(9)	172.2(13)
N(4)-H(04B)...	#3	0.904(16)	2.096(16)	2.7639(12)	129.9(13)
N(4)-H(04B)...	#4	0.904(16)	2.689(16)	3.2145(9)	118.0(12)
N(4)-H(04C)...		0.906(16)	1.811(16)	2.7116(12)	172.5(14)
O(1W)-H(01A)...	#5	0.828(19)	2.345(19)	3.1648(9)	170.7(17)
O(1W)-H(01B)...	#6	0.84(2)	2.30(2)	3.1298(9)	167.4(17)
N(2)-H(02)...	#1	0.837(18)	2.630(18)	3.4206(10)	158.0(15)

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Benutzte Symmetrieoperationen für die Generierung äquivalenter Atome:

#1 $x, y+1, z+1$

#2 $-x+1, -y+2, -z+1$

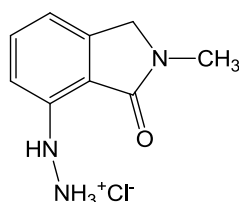
#3 $-x+2, -y+2, -z+1$

#4 $-x+2, -y+1, -z$

#5 $-x+1, -y+1, -z$

#6 $x, y+1, z$

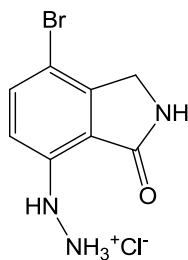
2-(2-Methyl-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25b**):



Nach AAV 1 aus 7-Amino-2-methylisindolin-1-on (**23b**, 174 mg, 1.07 mmol), Natriumnitrit (81 mg, 1.2 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (724 mg, 3.21 mmol). Das Rohprodukt wurde für weitere Syntheseschritte verwendet.

Schmp.: 199-201 °C; IR (KBr): 3434 cm^{-1} (NH), 3297 cm^{-1} (NH), 3190 cm^{-1} , 3082 cm^{-1} , 1605 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 3.08 (s, 3H, CH_3), 7.06 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.16 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.51 (dd, 1H, J = 7.5 Hz, 8.2 Hz, ArH), 8.53 (s, 1H, Hydrazin-NH), 10.51 (s, 3H, Hydrazin-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 29.1 (CH_3), 52.1 (CH_2); 113.5, 116.3, 132.7 (CH); 117.6, 142.9, 143.6, 168.2 (C); $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ (213.7).

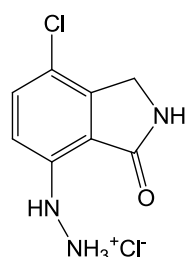
2-(7-Brom-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-iumchlorid (**25c**):



Nach AAV 1 aus 7-Amino-4-bromisindolin-1-on (**23c**, 454 mg, 2.00 mmol), Natriumnitrit (166 mg, 2.2 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (1.35 g, 6.00 mmol). Das Rohprodukt wurde für weitere Syntheseschritte verwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.35 (s, 2H, CH_2), 7.08 (d, 1H, $J = 8.6$, ArH), 7.72 (d, 1H, $J = 8.6$, ArH), 8.67 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 9.21 (s, 1H, Hydrazin-NH), 10.66 (s, 3H, Hydrazin-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 46.5 (CH_2); 115.8, 135.45 (CH); 107.9, 119.4, 143.1, 145.3, 170.3 (C); $\text{C}_8\text{H}_9\text{BrClN}_3\text{O}$ (278.5).

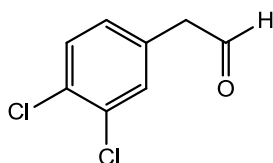
2-(7-Chlor-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25d**):



Nach AAV 1 aus 7-Amino-4-chlorisindolin-1-on (**23d**, 457 mg, 2.5 mmol), Natriumnitrit (190 mg, 2.75 mmol) und Zinn(II)chlorid-Dihydrat (1.69 g, 7.50 mmol). Das Rohprodukt wurde für weitere Syntheseschritte verwendet.

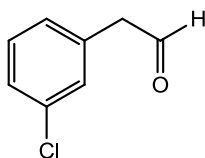
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 4.39 (s, 2H, Pyrrolidinon- CH_2), 7.08 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.55 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 8.39 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 9.04 (s, 1H, Hydrazin-NH), 9.95 (s, 3H, Hydrazinium- NH_3^+); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 44.7 (CH_2), 114.4, 132.5 (CH), 118.2, 118.4, 118.6, 143.0, 170.7 (C); $\text{C}_8\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ (234.1).

2-(3,4-Dichlorphenyl)acetaldehyd (**27b**):



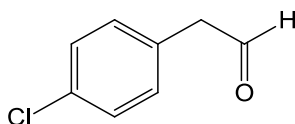
Nach AAV2 Methode B aus 2-(3,4-Dichlorphenyl)ethanol (520 μL , 3.72 mmol), Kaliumbromid (1.63 g, 7.50 mmol), Natriumhydrogencarbonat (625 mg, 7.44 mmol), Natriumhypochlorit ($c = 0.68$ M, 6.00 mL, 11.2 mmol) und TEMPO (6 mg, 0.6 mmol). Das Rohprodukt wurde als farbloses Öl erhalten und für weitere Reaktionen eingesetzt.

Lit.¹¹⁷

2-(3-Chlorphenyl)acetaldehyd (27c):

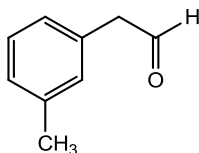
Nach AAV2 Methode A aus 2-(4-Chlorphenyl)ethanol (660 μ L, 5.00 mmol), PCC (1.63 g, 7.50 mmol). Das Rohprodukt wurde als farbloses Öl erhalten.

Lit.¹¹⁷

2-(4-Chlorphenyl)acetaldehyd (27d):

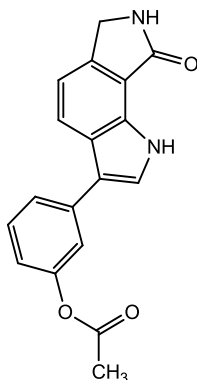
Nach AAV2 Methode A aus 2-(4-Chlorphenyl)ethanol (660 μ L, 5.00 mmol) und PCC (1.63 g, 7.50 mmol). Das Rohprodukt wurde als farbloses Öl erhalten und für weitere Reaktionen eingesetzt.

Lit.¹¹⁷

2-(3-Methylphenyl)acetaldehyd (27e):

Nach AAV2 Methode B aus 2-(3-Methylphenyl)ethanol (505 μ L, 3.72 mmol), Kaliumbromid (1.63 g, 7.50 mmol), Natriumhydrogencarbonat (625 mg, 7.44 mmol), Natriumhypochlorit (c = 0.68 M, 6.00 mL, 11.2 mmol) und TEMPO (6 mg, 0.6 mmol). Das Rohprodukt wurde als farbloses Öl erhalten und für weitere Reaktionen eingesetzt.

Lit.¹¹⁷

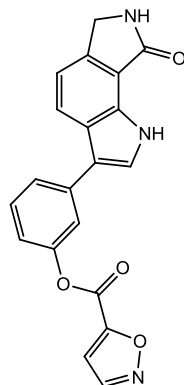
3-(8-Oxo-1,6,7,8-tetrahydropyrrolo[3,4-*g*]indol-3-yl)phenylacetat (**40a**):

Zu einer Lösung von 3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17l**, 151 mg, 0.57 mmol) in Pyridin (7 mL) wurden Dimethylaminopyridin (ca. 4 mg, cat.) und Acetanhydrid (60 μ L, 0.63 mmol) hinzugefügt. Die Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt, danach wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (20 mL) aufgenommen. Die entstandene Lösung wurde mit Wasser (20 mL) extrahiert, die so erhaltene wässrige Phase wurde erneut mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Ethylacetat/Ethanol/Triethylamin (6/2/2) als Elutionsmittel. Die Umkristallisation wurde aus Ethanol durchgeführt. Es wurden 51 mg (29.2%) des Produktes in Form gelblich-beiger Kristalle isoliert.

Schmp.: 185-186 °C; IR (KBr): 3337 cm^{-1} (NH), 3194 cm^{-1} (NH), 1741 cm^{-1} (C=O), 1678 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm) = 2.30 (s, 3H, CH_3), 4.48 (s, 2H, CH_2), 7.01 (ddd, 1H, J = 1.0 Hz, 2.3 Hz, 8.0 Hz, ArH), 7.29 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.45-7.49 (m, 2H, ArH), 7.59-7.62 (m, 1H, ArH), 7.67 (d, 1H, J = 2.3 Hz, ArH), 8.07 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 8.47 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.85 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 21.1 (CH_3), 45.6 (CH_2), 114.8, 118.8, 119.8, 122.6, 124.0, 124.4, 129.7 (CH), 115.3, 116.6, 125.0, 130.8, 136.6, 139.6, 150.9, 169.2, 170.3 (C); $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (306.3); ber. C 70.58, H 4.61, N 9.15; gef. C 70.29, H 4.59, N 8.87; MS (EI): m/z (%) = 306.1 $[\text{M}]^+$ (100), HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 306.09989, gef. 306.10020; HPLC (isokr.): 94.3% bei 254 nm und 96.4% bei 280 nm; t_N = 4.6 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.02 min (ACN/Wasser = 40/60); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear),

10.5-22 min (90/10), 93.4% bei 254 nm; $t_N = 9.4$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.18$ min; $\lambda_{\text{max}} = 270$ nm, 307 nm.

[3-(8-Oxo-1,6,7,8-tetrahydropyrrolo[3,4-*g*]indol-3-yl)phenyl]isoxazol-5-carboxylat (**40b**)

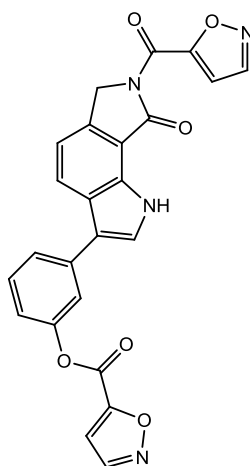


3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17l**, 132 mg, 0.50 mmol) wurde mit 4-Dimethylaminopyridin (12 mg, 0.1 mmol) und Diisopropylethylamin (171 μL , 1.00 mmol) in getrocknetem Pyridin (10 mL) unter Eiskühlung und Stickstoffbegasung suspendiert. Isoxazol-5-carbonsäurechlorid (100 μL , 1.00 mmol) wurden hinzugefügt und der Reaktionsansatz 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und die entstandene Lösung mit Wasser (20 mL) ausgeschüttelt, wobei die wässrige Phase anschließend erneut mit Ethylacetat (2 x 20 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck zur Trockene eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung einer Mischung aus Toluol/Ethylacetat/Eisessig (7/3/0.5) als Elutionsmittel.

Die Verbindung konnte nicht mit einer für die vollständige Charakterisierung ausreichenden Reinheit und Menge isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 600 MHz): 4.48 (s, 2H, CH_2), 7.22 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.4 Hz, 8.1 Hz, ArH), 7.29 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 7.49-7.62 (m, 2H, ArH), 7.68-7.79 (m, 3H, ArH), 8.13 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.46 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 8.97 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, Isoxazolyl-CH), 11.87 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 45.6 (CH_2), 110.6, 115.0, 118.5, 119.6, 122.8, 124.76, 124.79, 130.1, 152.3 (CH), 115.1, 116.7, 125.0, 130.9, 137.1, 139.7, 150.1, 154.9, 158.7, 170.4 (C); $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$ (359.3).

[3-(7-(Isoxazol-5-carbonyl)-8-oxo-1,6,7,8-tetrahydropyrrolo[3,4-*g*]indol-3-yl)phenyl]isoxazol-5-carboxylat (**42**)

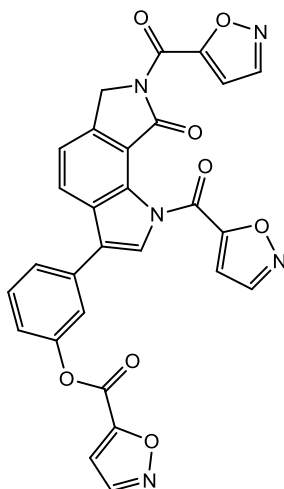


3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17I**, 66 mg, 0.3 mmol) wurde mit 4-Dimethylaminopyridin (6 mg, 0.05 mmol) und Diisopropylethylamin (86 μ L, 0.5 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (10 mL) unter Eiskühlung und Stickstoffbegasung suspendiert. Isoxazol-5-carbonsäurechlorid (42 μ L, 0.5 mmol) wurden hinzugefügt und der Reaktionsansatz 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (20 mL) aufgenommen und die entstandene Lösung mit Wasser (3 x 20 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck zur Trockene eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung wurde mit der präparativen HPLC unter Verwendung einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (40/60) als Fließmittel durchgeführt.

Die Verbindung konnte nicht mit einer für die vollständige Charakterisierung ausreichenden Reinheit und Menge isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): 5.16 (s, 2H, CH_2), 7.21 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, Isoxazolyl-CH), 7.25 (ddd, 1H, $J = 0.9$ Hz, 2.3 Hz, 8.1 Hz, ArH), 7.42 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.53-7.60 (m, 2H, ArH), 7.69-7.78 (m, 2H, ArH), 7.83 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.84 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, Isoxazolyl-CH), 8.97 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, Isoxazolyl-CH), 12.22 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Indol-NH) ; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 49.1 (CH_2), 107.1, 110.7, 114.9, 119.0, 119.8, 125.0, 125.6, 126.9, 130.2, 150.9, 152.3 (CH), 113.7, 115.9, 125.6, 131.2, 136.4, 138.1, 150.1, 154.9, 156.9, 158.7, 161.7, 166.0 (C); $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6$ (454.4).

[3-(1,7-Di(isoxazol-5-carbonyl)-8-oxo-1,6,7,8-tetrahydropyrrolo[3,4-*g*]indol-3-yl)phenyl]isoxazol-5-carboxylat (**43**):



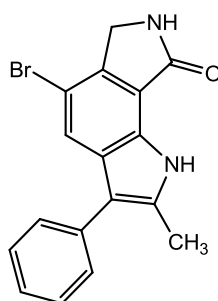
3-(3-Hydroxyphenyl)-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8-(1*H*)-on (**17l**, 132 mg, 0.50 mmol) wurde mit 4-Dimethylaminopyridin (12 mg, 0.1 mmol) und Diisopropylethylamin (171 μ L, 1.00 mmol) in getrocknetem Pyridin (10 mL) unter Eiskühlung und Stickstoffbegasung suspendiert. Isoxazol-5-carbonsäurechlorid (100 μ L, 1.00 mmol) wurden hinzugefügt und der Reaktionsansatz 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (50 mL) aufgenommen und die entstandene Lösung mit Wasser (20 mL) ausgeschüttelt, wobei die wässrige Phase anschließend erneut mit Ethylacetat (2 x 20 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (50 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck zur Trockene eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte unter Verwendung einer Mischung aus Toluol/Ethylacetat/Eisessig (7/3/0.5) als Elutionsmittel. Es wurden 45 mg (16.4%) des Produktes als weiß-gelbliches Pulver erhalten.

Um eine Reinheit $\geq 95\%$ zu erreichen wurde das Produkt zusätzlich mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt (ACN/Wasser = 50/50).

Schmp.: 179-180 °C; IR (KBr): 3429 cm^{-1} , 3117 cm^{-1} , 2360 cm^{-1} (N=C), 2341 cm^{-1} (N=C), 1749 cm^{-1} (C=O), 1732 cm^{-1} (C=O), 1708 cm^{-1} (C=O), 1674 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): 5.20 (s, 2H, CH_2), 6.99 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 7.42 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, 2.4 Hz, 8.2 Hz, ArH), 7.55 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.57 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, ArH), 7.66 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.76 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.79-7.81 (m, 1H, ArH), 7.84 (t, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.24

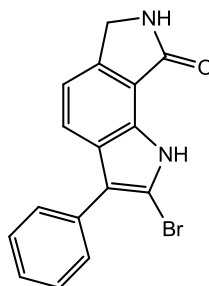
(s, 1H, ArH), 8.42 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.80 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 8.97 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 8.98 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 48.7 (CH_2); 107.4, 110.7, 111.6, 119.9, 120.8, 120.9, 125.9, 126.9, 127.2, 130.4, 150.9, 152.2, 152.3 (CH); 117.0, 120.9, 128.8, 130.0, 133.6, 140.6, 150.0, 154.8, 154.8, 156.5, 158.6, 160.2, 161.0, 164.2 (C); $\text{C}_{28}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_8$ (549.4); MS (EI): m/z (%) = 549.0 $[\text{M}]^+$ (100), HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 549.09151, gef. 549.09143; HPLC (isokr.): 97.0% bei 254 nm und 95.5% bei 280 nm; $t_N = 6.6$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.03$ min (ACN/Wasser = 50/50); HPLC (grad.): 97.1% bei 254 nm, $t_N = 11.9$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 237$ nm, 299 nm.

5-Brom-2-methyl-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**50a**):



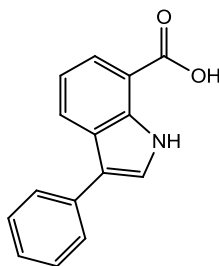
Nach AAV3 aus Phenylacetone (230 μL , 1.70 mmol), 2-(7-Brom-3-oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25c**, 474 mg, 1.70 mmol) und Natriumacetat (139 mg, 1.7 mmol). Es wurden 113 mg (19%) des Produktes als hellgelbe Nadeln erhalten.

Schmp.: 255-256 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3418 cm^{-1} , 3216 cm^{-1} (NH), 3077 cm^{-1} (CH, aromatisch), 2913 cm^{-1} (CH, aliphatisch), 1691 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 2.50 (s, 3H, CH_3), 4.35 (s, 2H, CH_2), 7.27-7.38 (m, 1H, ArH), 7.45-7.54 (m, 4H, ArH), 7.79 (s, 1H, ArH), 8.68 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.85 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 12.2 (CH_3), 46.3 (CH_2), 123.1, 125.9, 128.7 (2C), 128.9 (2C) (CH), 106.8, 112.6, 117.4, 128.7, 129.7, 134.4, 135.3, 137.1, 169.6 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}$ (341.2); ber. C 59.84, H 3.84, N 8.21; gef. C 58.51, H 4.02, N 7.73; MS (EI): m/z (%) = 340.0 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 340.02058, gef. 340.02053; HPLC (isokr.): 98.5% bei 254 nm und 97.9% bei 280 nm; $t_N = 6.0$ min, $t_M = 1.06$ min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 97.0% bei 254 nm, $t_N = 14.0$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 246$ nm, 318 nm.

2-Brom-3-phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (54):

3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-on (**17a**, 124 mg, 0.50 mmol) wurde in einer Mischung aus Dichlormethan (6 mL) und Eisessig (2 mL) unter Stickstoffbegasung mit einer Eis-Wasser Mischung auf unter 10 °C gekühlt. Dann wurde *N*-Bromsuccinimid (NBS; 98 mg, 0.6 mmol) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur 1.4 h gerührt. Nach Vollendung der Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen (30 mL) und mit Kaliumhydroxid-Lösung (10%, 3 x 15 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Wasser (30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol (96%). Es wurden 47 mg (28.7%) des Produktes als hellgelbes Pulver erhalten.

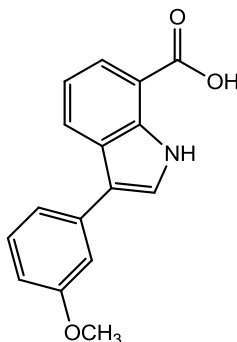
Schmp.: 248-250 °C; IR (KBr): 3409 cm⁻¹ (NH), 3182 cm⁻¹, 3052 cm⁻¹ (CH, aromatisch), 2864 cm⁻¹ (CH, aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm)= 4.46 (s, 2H, CH₂), 7.24 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.33-7.42 (m, 1H, ArH), 7.48-7.55 (m, 2H, ArH), 7.55-7.21 (m, 2H, ArH), 7.73 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 8.49 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 12.52 (s, 1H, Indol-NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 101 MHz): δ (ppm)= 45.5 (CH₂), 115.3, 121.7, 126.7, 128.6 (2C), 129.2 (2C) (CH), 109.1, 115.8, 116.1, 126.6, 130.3, 133.1, 140.1, 169.8 (C); C₁₆H₁₁BrN₂O (327.2); ber. C 58.74, H 3.39, N 8.56; gef. C 58.40, H 3.30, N 8.11; MS (EI): *m/z* (%) = 326.0 [M]⁺; HPLC (isokr.): 97.9% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm; *t*_N = 3.3 min, *t*_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/Wasser = 60/40); HPLC (grad.): 97.8% bei 254 nm, *t*_N = 12.2 min, *t*_M(DMSO) = 1.19 min; λ_{max} = 236 nm, 305 nm.

3-Phenyl-1*H*-indol-7-carbonsäure (56a):

Nach AAV3 aus 2-(2-Carboxyphenyl)hydrazin-1-iumchlorid (472 mg, 2.50 mmol), Phenylacetaldehyddimethylacetal (620 μ L, 3.75 mmol) und Natriumacetat (208 mg, 2.50 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung wurde unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (5/5/0.5) durchgeführt und aus Toluol umkristallisiert. Das Produkt konnte in Form hellgelber Kristalle (157 mg, 26.5%) isoliert werden.

Schmp.: 271-272 °C; IR (KBr): 3437 cm^{-1} (NH), 2856 cm^{-1} (COOH), 2569 cm^{-1} (COOH), 1654 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 7.21 (t, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 7.27 (tt, 1H, J = 1.2 Hz, 7.2 Hz, ArH), 7.46 (t, 2H, J = 7.6 Hz, ArH), 7.65 (d, 1H, J = 2.6 Hz, ArH), 7.69 (m, 2H, ArH), 7.82 (dd, 1H, J = 1.0 Hz, 7.5 Hz, ArH), 8.13 (dd, 1H, J = 1.0 Hz, 7.9 Hz), 11.31 (s, 1H, Indol-NH), 13.12 (s, 1H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 119.2, 124.3, 124.5, 124.8, 125.7, 126.9 (2C), 128.8 (2C) (CH), 113.9, 116.1, 126.6, 135.02, 135.5, 167.8 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (237.3): ber. C 75.94, H 4.67, N 5.90 gef. C 75.52, H 4.59, N 5.66; MS: (EI): m/z (%): 237.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 100% bei 254 nm und 100% bei 280 nm; t_N = 4.3 min, t_M (DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer($\text{pH } 2$) = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-22 min (90/10), 98,5% bei 254 nm; t_N = 9.9 min, t_M (DMSO) = 1.18 min; λ_{max} = 238 nm, 266 nm, 318 nm.

Lit.¹¹⁸

3-(3-Methoxyphenyl)-1*H*-indol-7-carbonsäure (56b):

Nach AAV4 aus 2-(2-Carboxyphenyl)hydrazin-1-iumchlorid (266 mg, 1.20 mmol), 3-Methoxystyren (82 μ L, 0.6 mmol), *p*-Benzochinon (75 mg, 0.7 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (4 mg, 15 μ mol) und Wasser (12.2 μ L, 0.60 mmol). Die säulenchromatographische Reinigung wurde unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (8/1/0.5) durchgeführt und im Anschluss wurde aus Toluol umkristallisiert. Das Produkt konnte in Form eines gelben Pulvers (136 mg, 21.2%) isoliert werden.

Schmp.: 235-236 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3437 cm^{-1} (NH), 2558 cm^{-1} (COOH), 1676 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 3.83 (s, 3H, CH_3), 6.85 (dd, 1H, J = 2.6 Hz, 8.3 Hz, ArH), 7.18-7.30 (m, 3H, ArH), 7.36 (t, 1H, J = 7.9 Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, J = 7.7 Hz, ArH), 7.82 (d, 1H, J = 7.6 Hz, ArH), 8.13 (d, 1H, J = 8.0 Hz, ArH), 11.31 (s, 1H, Indol-NH), 13.11 (s, 1H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 55.0 (CH_3), 111.5, 112.2, 119.2, 119.3, 124.3, 124.5, 125.0, 129.8 (CH), 113.9, 116.1, 126.6, 135.4, 136.4, 159.7, 167.8 (C); $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (267.3): ber. C 71.90, H 4.90, N 5.24 gef. C 71.83, H 4.90, N 5.23; MS: (EI): m/z (%): 267.1 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 98.5% bei 254 nm und 96.4% bei 280 nm; t_N = 4.0 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.06 min (ACN/Puffer = 50/50); HPLC (grad.): Acetonitril/Wasser 0-10 min (10/90 \rightarrow 70/30, linear), 10-10.5 min (70/30 \rightarrow 90/10, linear), 10.5-16.5 min (90/10), 95.5% bei 254 nm, t_N = 10.5 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.20 min; λ_{max} = 267 nm, 317 nm.

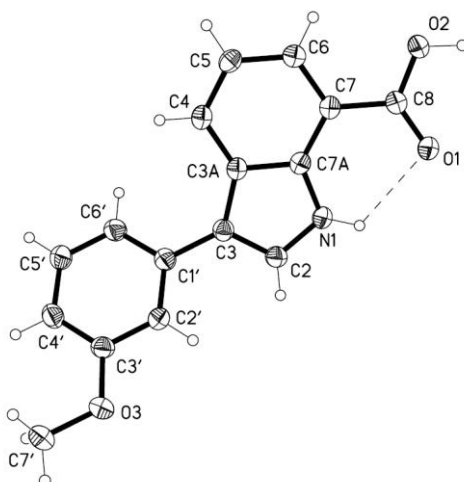


Abbildung 57: Röntgenkristallstruktur von Verbindung **56b**.

Tabelle 20: Kristalldaten und statistische Parameter.

Summenformel	$C_{16}H_{13}NO_3$
M_r	267.27 g/mol
Temperatur	100(2) K
Wellenlänge	1.54184 Å
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$P2_1/n$
Elementarzelle	$a = 13.9320(9)$ Å, $b = 5.1779(4)$ Å, $c = 18.3265(12)$ Å;
	$\alpha = 90^\circ$, $\beta = 104.763(7)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$
Volumen	$1278.41(15)$ Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.389 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	0.792 mm ⁻¹
Strukturfaktor F (000)	560
Kristallgröße	$0.20 \times 0.20 \times 0.02$ mm ³
Θ -Bereich für die Datensammlung	$3.58^\circ - 75.65^\circ$
Limitierende Indices (hkl)	$-17 \leq h \leq 17$, $-6 \leq k \leq 6$, $-23 \leq l \leq 22$
Anzahl aufgenommener Reflexionen	24866
Anzahl unabhängiger Reflexionen	2658 [R(int) = 0.0398]
Vollständigkeit der Reflexionen bis $\Theta = 75.00^\circ$	100.0 %
Absorptionskorrektur	Semi-empirisch von Äquivalenten
maximale und minimale Transmission	1.00000 and 0.73833
<i>Refinement</i> -Methode	<i>Full-matrix least-squares on F²</i>
Daten/Einschränkungen/Parameter	2658 / 0 / 190
<i>Goodness-of-fit on F²</i>	1.040
Finale R Indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0352$, $wR2 = 0.0909$
R Indices (alle Daten)	$R1 = 0.0416$, $wR2 = 0.0967$
Größte Differenzpeaks	0.159 and -0.197 e.Å ⁻³

Tabelle 21: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotropische Verschiebungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).^{a, b}

	x	y	z	U(eq)
N(1)	3047.8(8)	3378(2)	642.0(6)	25.2(2)
C(2)	4000.1(9)	4333(2)	821.6(7)	26.2(3)
C(3)	4068.2(9)	6476(2)	1268.9(7)	24.4(3)
C(3A)	3091.0(9)	6873(2)	1382.2(6)	22.3(3)
C(4)	2674.0(9)	8709(2)	1773.7(6)	24.1(3)
C(5)	1677.8(9)	8547(2)	1760.0(6)	24.6(3)
C(6)	1077.2(9)	6605(2)	1352.8(6)	23.7(3)
C(7)	1460.4(9)	4752(2)	952.3(6)	22.5(3)
C(7A)	2474.4(9)	4899(2)	973.2(6)	22.5(2)
C(8)	825.3(9)	2731(2)	514.1(6)	22.9(3)
O(1)	1126.5(6)	1296.8(17)	74.7(5)	26.6(2)
O(2)	-66.4(6)	2560.0(18)	623.6(5)	27.5(2)
O(3)	6916.0(7)	10538(2)	727.1(6)	35.4(2)
C(1')	4950.7(9)	8121(2)	1525.9(7)	25.1(3)
C(2')	5568.2(9)	8568(2)	1048.1(7)	26.6(3)
C(3')	6379.8(9)	10223(3)	1256.3(7)	27.5(3)
C(4')	6587.2(10)	11480(3)	1950.1(7)	30.2(3)
C(5')	5975.7(10)	11014(3)	2430.7(7)	31.5(3)
C(6')	5173.0(9)	9352(3)	2229.1(7)	28.6(3)
C(7')	7668.2(10)	12481(3)	878.9(8)	34.9(3)

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.^b U_{eq} ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors.**Tabelle 22:** Bindungslängen [\AA].^a

N(1)-C(7A)	1.3690(16)	C(7)-C(8)	1.4699(16)
N(1)-C(2)	1.3750(16)	C(8)-O(1)	1.2442(15)
C(2)-C(3)	1.3687(17)	C(8)-O(2)	1.3109(14)
C(3)-C(3A)	1.4433(16)	O(3)-C(3')	1.3763(15)
C(3)-C(1')	1.4708(17)	O(3)-C(7')	1.4281(16)
C(3A)-C(4)	1.4032(17)	C(1')-C(2')	1.3943(17)
C(3A)-C(7A)	1.4198(17)	C(1')-C(6')	1.3999(18)
C(4)-C(5)	1.3843(17)	C(2')-C(3')	1.3924(18)
C(5)-C(6)	1.3963(17)	C(3')-C(4')	1.3916(19)
C(6)-C(7)	1.3944(17)	C(4')-C(5')	1.3936(18)
C(7)-C(7A)	1.4054(17)	C(5')-C(6')	1.3849(18)

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 23: Bindungswinkel [°].^a

C(7A)-N(1)-C(2)	108.88(10)	C(7)-C(7A)-C(3A)	121.49(11)
C(3)-C(2)-N(1)	110.50(11)	O(1)-C(8)-O(2)	123.23(11)
C(2)-C(3)-C(3A)	106.11(11)	O(1)-C(8)-C(7)	121.54(11)
C(2)-C(3)-C(1')	125.87(11)	O(2)-C(8)-C(7)	115.24(10)
C(3A)-C(3)-C(1')	127.87(11)	C(3')-O(3)-C(7')	116.70(10)
C(4)-C(3A)-C(7A)	118.95(11)	C(2')-C(1')-C(6')	118.39(12)
C(4)-C(3A)-C(3)	134.31(11)	C(2')-C(1')-C(3)	119.62(11)
C(7A)-C(3A)-C(3)	106.72(10)	C(6')-C(1')-C(3)	121.94(11)
C(5)-C(4)-C(3A)	119.55(11)	C(3')-C(2')-C(1')	121.20(12)
C(4)-C(5)-C(6)	121.00(11)	O(3)-C(3')-C(4')	124.39(12)
C(7)-C(6)-C(5)	121.28(11)	O(3)-C(3')-C(2')	115.37(11)
C(6)-C(7)-C(7A)	117.72(11)	C(4')-C(3')-C(2')	120.22(12)
C(6)-C(7)-C(8)	121.30(11)	C(3')-C(4')-C(5')	118.59(12)
C(7A)-C(7)-C(8)	120.97(11)	C(6')-C(5')-C(4')	121.41(12)
N(1)-C(7A)-C(7)	130.74(11)	C(5')-C(6')-C(1')	120.18(12)
N(1)-C(7A)-C(3A)	107.77(10)		

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 24: Torsionswinkel [°].^a

C(7A)-N(1)-C(2)-C(3)	-0.04(14)	C(3)-C(3A)-C(7A)-C(7)	-178.81(10)
N(1)-C(2)-C(3)-C(3A)	0.57(14)	C(6)-C(7)-C(8)-O(1)	169.98(11)
N(1)-C(2)-C(3)-C(1')	-175.27(11)	C(7A)-C(7)-C(8)-O(1)	-9.18(17)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(4)	-179.49(13)	C(6)-C(7)-C(8)-O(2)	-10.22(16)
C(1')-C(3)-C(3A)-C(4)	-3.8(2)	C(7A)-C(7)-C(8)-O(2)	170.63(10)
C(2)-C(3)-C(3A)-C(7A)	-0.86(13)	C(2)-C(3)-C(1')-C(2')	35.81(19)
C(1')-C(3)-C(3A)-C(7A)	174.87(12)	C(3A)-C(3)-C(1')-C(2')	-139.12(13)
C(7A)-C(3A)-C(4)-C(5)	0.64(17)	C(2)-C(3)-C(1')-C(6')	-146.88(13)
C(3)-C(3A)-C(4)-C(5)	179.15(12)	C(3A)-C(3)-C(1')-C(6')	38.19(19)
C(3A)-C(4)-C(5)-C(6)	-0.98(18)	C(6')-C(1')-C(2')-C(3')	-0.87(19)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0.60(18)	C(3)-C(1')-C(2')-C(3')	176.54(12)
C(5)-C(6)-C(7)-C(7A)	0.13(17)	C(7')-O(3)-C(3')-C(4')	-6.50(19)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-179.05(11)	C(7')-O(3)-C(3')-C(2')	171.77(12)
C(2)-N(1)-C(7A)-C(7)	179.09(12)	C(1')-C(2')-C(3')-O(3)	-178.67(12)
C(2)-N(1)-C(7A)-C(3A)	-0.51(13)	C(1')-C(2')-C(3')-C(4')	-0.3(2)
C(6)-C(7)-C(7A)-N(1)	179.98(12)	O(3)-C(3')-C(4')-C(5')	179.11(12)
C(8)-C(7)-C(7A)-N(1)	-0.83(19)	C(2')-C(3')-C(4')-C(5')	0.9(2)
C(6)-C(7)-C(7A)-C(3A)	-0.46(17)	C(3')-C(4')-C(5')-C(6')	-0.3(2)
C(8)-C(7)-C(7A)-C(3A)	178.73(11)	C(4')-C(5')-C(6')-C(1')	-0.9(2)
C(4)-C(3A)-C(7A)-N(1)	179.73(10)	C(2')-C(1')-C(6')-C(5')	1.5(2)
C(3)-C(3A)-C(7A)-N(1)	0.84(13)	C(3)-C(1')-C(6')-C(5')	-175.89(12)
C(4)-C(3A)-C(7A)-C(7)	0.08(17)		

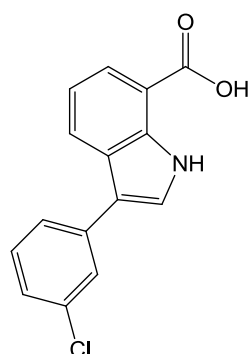
^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

Tabelle 25: Wasserstoffbrückenbindungen [Å und °]; D = Donator, A = Akzeptor, H = Wasserstoff.^a

D-H...A		$\Delta(\text{D-H})$	$\Delta(\text{H...A})$	$\Delta(\text{D...A})$	$\angle(\text{DHA})$
N(1)-H(01)...O(1)		0.872(18)	2.330(17)	2.8265(14)	116.3(13)
N(1)-H(01)...O(3)	#1	0.872(18)	2.485(17)	3.2365(14)	144.7(14)
O(2)-H(02)...O(1)	#2	0.98(2)	1.63(2)	2.6160(12)	176.8(19)

^a Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen der auf die letzte Nachkommastelle bezogenen Standardabweichung.

3-(3-Chlorphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (56c):

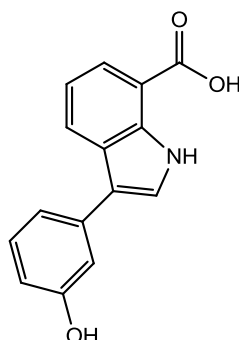


Nach AAV3 aus 2-(2-Carboxyphenyl)hydrazin-1-iumchlorid (266 mg, 1.20 mmol), 3-Chlorstyren (75 μL , 0.6 mmol), *p*-Benzochinon (75 mg, 0.7 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ (4 mg, 15 μmol) und Wasser (12.2 μL , 0.60 mmol). Es wurden vier Reaktionen gleichzeitig im Parallelsynthesereaktor durchgeführt und die Ansätze zur Reinigung vereinigt. Die säulenchromatographische Reinigung wurde unter Verwendung von Toluol/Ethylacetat/Eisessig (8/1/0.5) durchgeführt und zweimal aus Toluol/Hexan (4+1) umkristallisiert. Das Produkt konnte in Form eines gelben Pulvers (50 mg, 7.67%) isoliert werden.

Schmp.: 214-215 °C; IR (KBr): 3448 cm^{-1} (NH), 1662 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 7.24 (t, 1H, J = 7.8 Hz, ArH), 7.32 (ddd, 1H, J = 1.0 Hz, 2.1 Hz, 8.0 Hz), 7.47 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 7.69 (ddd, 1H, J = 1.0 Hz, 1.7 Hz, 7.8 Hz, ArH), 7.72 (t, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 7.77 (d, 1H, J = 2.7 Hz, ArH), 7.84 (dd, 1H, J = 1.1 Hz, 7.5 Hz), 8.13 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 11.43 (s, 1H, Indol-NH), 13.16 (s, 1H, COOH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 119.4, 124.3, 124.4, 125.3, 125.4, 125.7, 126.2, 130.6 (CH), 114.0, 114.5, 126.1, 133.5, 135.4, 137.2, 167.6 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ (271.7): ber. C 66.31, H 3.71, N 5.16, gef. C 66.35, H 3.34, N 5.26; MS: (EI): m/z (%): 271.0 $[\text{M}]^+$ (100); HPLC (isokr.): 96.9% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; t_N = 3.8 min, $t_M(\text{DMSO})$ = 1.09 min (ACN/Puffer = 60/40); HPLC (grad.): Aceto-

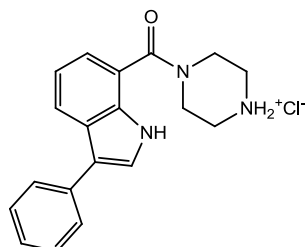
nitril/Wasser 0-10 min (10/90→70/30, linear), 10-10.5 min (70/30→90/10, linear), 10.5-22 min (90/10), 98.3% bei 254 nm, $t_N = 11.6$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.15$ min; $\lambda_{\text{max}} = 274$ nm, 317 nm.

3-(3-Hydroxyphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure(56d):



Nach AAV8 aus 3-(3-Methoxyphenyl)-1H-indol-7-carbonsäure (**56b**, 120 mg, 0.45 mmol) und Bortribromid gelöst in Dichlormethan ($c = 1$ M, 2.3 mL, 2.3 mmol). Es wurden 111 mg (97.4%) des Rohprodukts erhalten, welches ohne weitere Aufarbeitung für folgende Synthesen verwendet wurde.

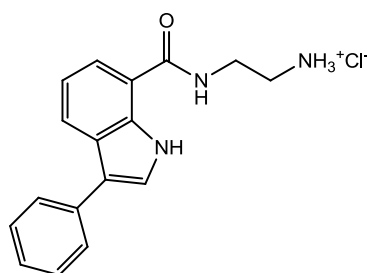
(3-Phenyl-1H-indol-7-yl)(piperazin-1-yl)methanon-Hydrochlorid (58a):



tert-Butyl-4-(3-phenyl-1H-indol-7-carbonyl)piperazin-1-carboxylat (**19q**, 190 mg, 0.47 mmol) wird in getrocknetem Dichlormethan (5 mL) gelöst. Dann wird Trifluoressigsäure (1 mL) hinzugefügt und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel unter Vakuum verdampft und der Rückstand in 2-Propanol (1 mL) aufgenommen. Es wird propanolische Salzsäure (5 M, 1 Trp), sowie Diethylether (10 mL) hinzugefügt. Der so entstandene Niederschlag wird unter Vakuum filtriert, mit Diethylether (20 mL) gewaschen, in Ethanol gelöst, filtriert und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Es wurden 71 mg (44.2%) des Produkts als weiß-graues Pulver isoliert.

Schmp.: 98-100 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3432 cm^{-1} (NH), 2484 cm^{-1} (CNH_2^+), 1677 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 3.18 (s, 4H, CH_2), 3.72 (s, 4H, CH_2), 7.18 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.22 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, 1.2 Hz, ArH), 7.27 (tt, 1H, $J = 7.5$ Hz, 1.2 Hz, ArH), 7.42-7.47 (m, 2H, ArH), 7.62-7.72 (m, 2H, ArH), 7.74 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, ArH), 7.97 (d, 1H, $J = 7.6$, ArH), 9.19 (s, 2H, Piperazin- NH_2^+), 11.46 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, Indol-NH) ; ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm)= 42.5 (CH_2), 119.3, 120.3, 120.7, 124.5, 125.5, 126.6 (2C), 128.7 (2C) (CH), 116.1, 119.0, 125.8, 132.9, 135.1, 167.5 (C); $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}$ (341.8); MS: (EI): m/z (%): 305.1 $[\text{M}]^+$ (100), ESI: m/z (%): 165.06998, 220.07571, 306.16026 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 328.14206 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 384.17418 $[\text{361}+\text{Na}]^+$, 406.15602 $[\text{M}+\text{Boc}+\text{H}]^+$, 611.31333 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 633.29500 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 916.46638 $[\text{3M}+\text{H}]^+$, 938.44814 $[\text{3M}+\text{Na}]^+$; HPLC (isokr.): 99.6% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; $t_N = 5.3$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.12$ min (ACN/Puffer = 25/75); $\lambda_{\text{max}} = 266$ nm.

2-(3-Phenyl-1H-indol-7-carboxamido)ethanaminium-Hydrochlorid (**58b**):

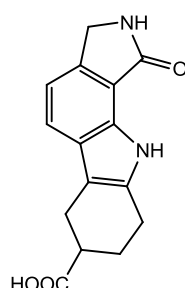


tert-Butyl-(2-(3-phenyl-1H-indol-7-carboxamido)ethyl)carbamate (**19r**, 51 mg, 0.1 mmol) wird in getrocknetem Dichlormethan (5 mL) gelöst. Dann wird Trifluoressigsäure (1 mL) hinzugefügt und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel unter Vakuum verdampft und der Rückstand in 2-Propanol (1 mL) aufgenommen. Es wird propanolische Salzsäure (5 M, 1 Trp), sowie Diethylether (10 mL) hinzugefügt. Der so entstandene Niederschlag wird unter Vakuum filtriert, mit Diethylether (20 mL) gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 10 mg (24.4%) des Produkts als weiß-graues Pulver isoliert.

Schmp.: 265-266 °C (Zersetzung); IR (KBr): 3415 cm^{-1} , 3294 cm^{-1} (NH), 1637 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ (ppm)= 3.06 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, CH_2), 3.61 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 7.19 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, ArH), 7.26 (tt, 1H, $J = 7.4$ Hz, 1.2 Hz, ArH), 7.41-7.48 (m, 2H, ArH), 7.66 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, ArH), 7.67-7.71 (m, 2H, ArH), 7.81 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 8.03-8.13

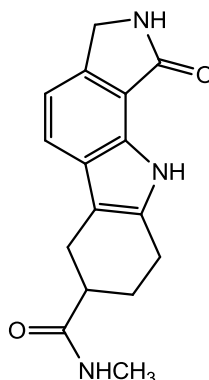
(m, 4H, NH_3^+ , ArH), 8.83 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, Amid-NH), 11.35 (s, 1H, Indol-NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ (ppm) = 36.8, 38.5 (CH_2), 118.8, 120.7, 122.7, 124.6, 125.5, 126.7 (2C), 128.8 (2C) (CH), 115.6, 116.9, 126.4, 134.9, 135.1, 167.4 (C); $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}$ (315.8): ber. C 64.66, H 5.74, N 13.31, gef. C 63.13, H 5.51, N 12.49; MS: (EI): m/z (%): 279.1 $[\text{M}-\text{HCl}]^+$ (100) HRMS (EI): m/z $[\text{M}-\text{HCl}]^+$ ber. 279.13661, gef. 279.13569; HPLC (isokr.): 99.7% bei 254 nm und 99.7% bei 280 nm; $t_N = 3.42$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.04$ min (ACN/Puffer = 30/70); $\lambda_{\text{max}} = 239$ nm, 266 nm, 315 nm.

1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*g*]carbazol-7-carbonsäure (60):



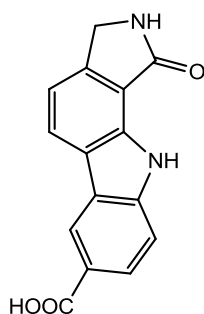
Nach AAV3 aus 2-(3-Oxoisindolin-4-yl)hydrazin-1-ium-Hydrochlorid (**25a**, 399 mg, 2.00 mmol), 4-Oxocyclohexancarbonsäure (**59**, 313 mg, 2.20 mmol) und Natriumacetat (164 mg, 2.0 mmol). Es wurden 50 mg (9.3%) eines gelblich-beigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 264-265 °C; IR (KBr): 3359 cm^{-1} (NH), 3259 cm^{-1} (NH), 1700 cm^{-1} (C=O), 1632 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) = 1.77-1.92 (m, 1H, Cyclohexyl- CH_2), 2.14-2.22 (m, 1H, Cyclohexyl- CH_2), 2.66-2.90 (m, 4H, Cyclohexyl- CH_2), 2.91-3.00 (m, 1H, Cyclohexyl-CH), 4.41 (s, 2H, Pyrrolidinon- CH_2), 7.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.58 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.29 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.14 (s, 1H, Indol-NH), 12.26 (s, 1H, Carbonsäure-OH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm) = 21.9, 23.4, 25.4, 45.5 (CH_2), 39.4, 113.0, 120.8 (CH), 107.2, 115.4, 127.2, 129.9, 134.8, 137.9, 170.7, 176.4 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ (270.3); ber. C 66.66, H 5.22, N 10.36; gef. C 65.65, H 5.15, N 9.91; MS (EI): m/z (%) = 270.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 270.09989; gef.: 270.09963; HPLC (isokrat.): 99.2% bei 254 nm und 99.9% bei 280 nm; $t_N = 3.8$ min, $t_M = 1.06$ min (ACN/Puffer = 25/75); HPLC (grad): 96.5% bei 254 nm, $t_N = 7.8$ min, $t_M = 1.19$ min; $\lambda_{\text{max}} = 235$ nm, 309 nm.

N-Methyl-1-oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-g]carbazol-7-carboxamid(61):

Nach AAV6 aus 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-g]carbazol-7-carbonsäure (**60**, 135 mg, 0.5 mmol), Methylamin in THF ($c = 2.00$ M, 300 μ L, 0.57 mmol), Diisopropylethylamin (390 μ L, 2.30 mmol) und PyBOP (297 mg, 0.57 mmol). Abweichend von AAV6 wurde der beim Extrahieren zwischen den Phasen vorhandene Niederschlag durch Filtration isoliert. Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol (80%). Es wurden 41 mg (28.9%) des Produktes als weiß-gelbliches Pulver isoliert.

Schmp.: 164-166°C; IR (KBr): 3392 cm^{-1} (NH), 3194 cm^{-1} (NH), 3061 cm^{-1} , 2934 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} (C=O), 1642 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm)= 1.69-1.89 (m, 1H, Cyclohexan- CH_2), 1.96-2.08 (m, 1H, Cyclohexan- CH_2), 2.63 (d, 3H, $J = 4.6$ Hz, CH_3), 2.65-2.76 (m, 3H, Cyclohexan), 2.79-2.92 (m, 2H, Cyclohexan), 4.42 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 7.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 7.56 (d, 1H, $J = 8.0$, ArH), 7.84 (q, 1H, $J = 4.5$ Hz, Amid-NH), 8.28 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 11.11 (s, 1H, Indol-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 101 MHz): δ (ppm)= 25.5 (CH_3), 22.3, 24.3, 26.2, 45.5 (CH_2), 41.0, 113.1, 120.9 (CH), 107.6, 115.4, 127.3, 130.0, 134.8, 138.0, 170.8, 175.3 (C); $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (269.3); ber. C 66.90, H 5.61, N 15.60; gef. C 65.47, H 6.53, N 13.90; MS (EI): m/z (%) = 283.1 $[\text{M}]^+$, HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 283.13153., gef. 283.13165; HPLC (isokrat.): 99.3% bei 254 nm und 93.8% bei 280 nm; $t_N = 7.3$ min, $t_M(\text{DMSO}) = 1.16$ min (ACN/Wasser = 20/80); HPLC (grad.): 93.5% bei 254 nm, $t_N = 7.5$ min, $t_M = 1.20$ min; $\lambda_{\text{max}} = 264$ nm, 309 nm.

1-Oxo-1,2,3,10-tetrahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure (62):

1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*g*]carbazol-7-carbonsäure (**60**, 133 mg, 0.49 mmol) wird in 1,4-Dioxan (20 mL) suspendiert. Nach dem Hinzufügen von DDQ (246 mg, 1.08 mmol) wird das Gemisch für 19 h zum Reflux erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Ansatz in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und mit Wasser (3 x 40 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und auf Kieselgel (ca. 1.5 g) aufgezogen. Reinigung mittels Säulenchromatographie unter Verwendung einer Mischung aus Toluol/Ethylacetat/Eisessig (5/5/0.5) und anschließender Umkristallisation aus Ethanol. Es wurden 7 mg (5.4%) des Produkts als braunes Pulver erhalten.

Die Verbindung konnte nicht mit einer für die vollständige Charakterisierung ausreichenden Reinheit und Menge isoliert werden.

Schmp.: 260 °C (Zersetzung); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm)= 4.55 (s, 2H, CH₂), 7.38 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 7.67 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz, 8.3 Hz, ArH), 8.02 (dd, 1H, *J* = 1.7 Hz, 8.5 Hz, ArH), 8.47 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, ArH), 8.57 (s, 1H, Pyrrolidinon-NH), 8.81-8.83 (m, 1H, ArH), 12.12 (s, 1H, Indol-NH), 12.59 (s, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 151 MHz): δ (ppm)= 46.0 (CH₂), 111.6, 114.4, 122.3, 124.0, 126.9 (CH), 116.0, 121.6, 121.8, 122.5, 134.9, 143.0, 143.7, 168.0, 170.2 (C); C₁₅H₁₅N₃O₂ (266.1); HPLC (isokrat.): 78.1% bei 254 nm und 88.4% bei 280 nm; t_N = 3.8 min, t_M(DMSO) = 1.06 min (ACN/Puffer = 25:75), λ_{max} = 241 nm, 285 nm.

Anhang zu Abschnitt 10.2: Gefahrstoffverzeichnis

Bei der Verwendung aller im Rahmen dieser Arbeit genannten Chemikalien und Gefahrstoffe müssen die Gefahren- und Sicherheitshinweise (H- und P-Sätze, *hazard and precautionary statements*) beachtet werden, welche im Rahmen des global harmonisierten Systems zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS, *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) entwickelt wurden sind. Bei den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten.

Bortribromid

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS06.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H330*: Lebensgefahr bei Einatmen. *H300*: Lebensgefahr bei Verschlucken. *H314*: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. *EU014*: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: *P280*: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. *P304+P340*: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. *P301+P330+P331*: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. *P305+P351+P338*: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. *P309+P310*: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. *P403+P233*: Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

2,3-Dichlor-5,6-dicyan-*p*-benzochinon (DDQ)

Gefahrenpiktogramme: GHS06.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H301*: Giftig bei Verschlucken. *EUH029*: Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.

Sicherheitshinweise: *P260*: Staub nicht einatmen. *P262*: Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen. *P309+P310*: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Dichlormethan

Gefahrenpiktogramme: GHS08.

Signalwort: Achtung.

Gefahrenhinweise: *H351:* Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: *P260:* Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. *P281:* Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. *P308+P313:* Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Diethylether

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H224:* Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar. *H302:* Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. *H336:* Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. *EUH019:* Kann explosionsfähige Peroxide bilden. *EU066:* Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

Sicherheitshinweise: *P210:* Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. *P261:* Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. *P301+P312:* Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP)

Gefahrenpiktogramme: GHS06.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H301:* Giftig bei Verschlucken. *H310:* Lebensgefahr bei Hautkontakt. *H315:* Verursacht Hautreizungen. *H319:* Verursacht schwere Augenreizung. *H335:* Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: *P261:* Einatmen von Staub vermeiden. *P280:* Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen. *P301 + P310:* Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. *P302 + P350:* Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen. *P305 + P351 + P338:* Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam

mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

***N,N*-Dimethylformamid**

Gefahrenpiktogramm: GHS02, GHS08, GHS07.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H360D*: Kann das Kind im Mutterleib schädigen. *H226*: Flüssigkeit und Dampf entzündbar. *H319*: Verursacht schwere Augenreizungen. *H332*: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. *H312*: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.

Sicherheitshinweise: *P302+352*: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. *P305+351+338*: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. *P308+313*: Bei Explosion oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

1,4-Dioxan

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07, GHS08.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H225-EU019*: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Kann explosionsfähige Peroxide bilden. *H319-EUH066*: Verursacht schwere Augenreizung. Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen. *H351*: Kann vermutlich Krebs erzeugen. *H335*: Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: *P210*: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. *P281*: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. *P305+P351+P338*: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. *P308+P313*: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Iodethan

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS08.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H302:* Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. *H315:* Verursacht Hautreizungen. *H317:* Kann allergische Hautreaktionen verursachen. *H319:* Verursacht schwere Augenreizungen. *H334:* Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. *H335:* Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: *P261:* Einatmen von Dampf vermeiden. *P280:* Schutzhandschuhe tragen. *P305 + P351 + P338:* Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. *P342 + P311:* Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Iodmethan

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS08.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H301:* Giftig bei Verschlucken. *H312:* Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. *H315:* Verursacht Hautreizungen. *H331:* Giftig bei Einatmen. *H335:* Kann die Atemwege reizen. *H351:* Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: *P261:* Einatmen von Dampf vermeiden. *P280:* Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung tragen. *P301 + P310:* BEI VERSCHLUCKEN: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. *P311:* Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Phenylhydrazin und seine Derivate

Gefahrenpiktogramme: GHS08, GHS06, GHS09.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H350:* Kann Krebs erzeugen. *H341:* Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. *H331:* Giftig bei Einatmen. *H311:* Giftig bei Hautkontakt. *H301:* Giftig bei Verschlucken. *H372:* Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. *H319:* Verursacht schwere Augenreizung. *H315:* Verursacht Hautreizungen. *H317:* Kann allergische Hautreaktionen verursachen. *H400:* Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: *P201:* Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. *P281:* Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. *P273:* Freisetzung in die Umwelt vermeiden. *P304+340:* Bei Einatmen an die frische Luft bringen und in einer Position

ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. *P302+310*: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Tetrahydrofuran

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07, GHS08.

Signalwort: Gefahr.

Gefahrenhinweise: *H225*: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. *H319*: Verursacht schwere Augenreizung. *H335*: Kann die Atemwege reizen. *H351*: Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: *P210*: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht

rauchen. *P261*: Einatmen von Dampf vermeiden. *P281*: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. *P305 + P351 + P338*: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. *EUH019*: Kann explosionsfähige Peroxide bilden.

10.3 Virtuelles Screening

Als Ausgangsdatenbanken wurden die ZINC-Standard-Datenbank (*all purchasable*)^{96, 119} und die ChEMBL Kinase-SARfari-Datenbank¹⁰⁷ verwendet, welche beide im Internet frei verfügbar waren und im SMILES-Format heruntergeladen wurden. Erstere umfasste zum Zeitpunkt der Untersuchungen ca. 19 Millionen Verbindungen, während letztere ca. 50,000 Verbindungen beinhaltete. Die Substanzen wurden vor der weiteren Verwendung einem Filterprozess unterzogen, in dem Moleküle, die zur Weiterentwicklung zu Wirkstoffen ungeeignet waren, ausgeschlossen wurden. Dabei wurden die in Tabelle 26 aufgeführten Kriterien in dem *workflow*-Programm Pipeline Pilot⁹⁸ angewendet.

Tabelle 26: Filterkriterien für die Prozessierung der initialen Datenbanken.

Filter	Wert
Molekulare Masse [g/mol]	≤ 400
logD	≤ 5.5
Anzahl rotierbarer Bindungen	≥ 1
Anzahl der kleinsten Ringe im kleinsten Ringsystem	≤ 5
Anzahl der Fragmente bei Entfernung aller Nicht-Ringbindungen	≤ 3
Abtrennung des kleineren Salzfragments	ja

Fingerprint-Suche

Die *fingerprint*-Suche wurde ebenso wie der Filter-Prozess in Pipeline Pilot durchgeführt, wobei die gefilterten Datenbanken als *.smi-Dateien eingesetzt wurden.

Bei den als Template verwendeten Molekülen handelte es sich um die von DETERMANN⁴⁸ synthetisierten Strukturen **18** in Kombination mit Verbindung **17a-e**, **17k** und **22a**. Zusätzlich wurden der Template-Bibliothek vier Verbindungen aus einem Fragment-Verbindungsprozess, der mit MOE ausgeführt wurde, hinzugefügt. Zur Erzeugung dieser Moleküle wurde zum einen das *hinge*-Bindungselement von Debromohymenialdisin **7** in CLK1 als Fragment eingesetzt. Das Fragment bestand dabei aus der Lactam-Gruppe und den jeweils angrenzenden aliphatischen Kohlenstoffatomen, wobei die Wasserstoffatome als Anknüpfungspunkt für die Verbindungsglieder (*linker*) dienten. Zum anderen wurde das Pyrrolidin-Fragment aus einer ungewöhnlichen *docking*-Pose von Verbindung **17a** verwendet, welches in dieser Orientierung eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asp250

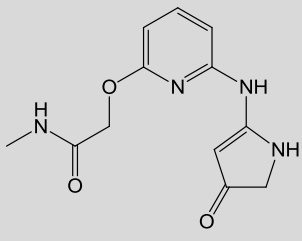
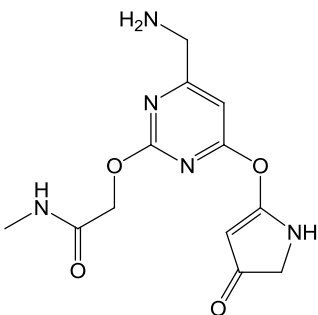
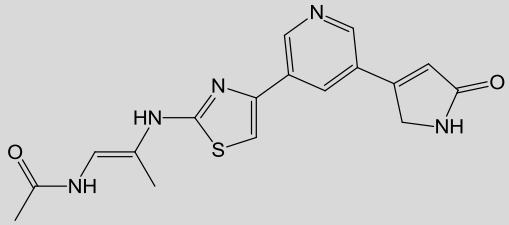
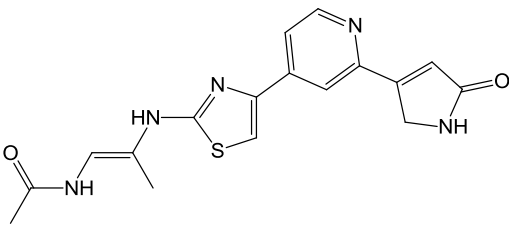
eingeht. Bei den Anknüpfungspunkten für die Verbindungsglieder handelte es sich um die Wasserstoffatome, die sich an den vorherigen Anellierungspositionen des Pyrrolidins befanden. Als *linker*-Bibliothek wurde die Standard-Bibliothek von MOE verwendet. Zusätzlich zu den Fragmenten wurde bei der Erstellung des künstlichen Fusionsmoleküls auch die ATP-Bindetasche der CLK1-Kristallstruktur (PDB: 1Z57) berücksichtigt, die wie unter Kapitel 10.4 beschrieben dafür vorbereitet worden war. Des Weiteren wurden Filter angewendet, um aus der Gesamtzahl möglicher Verbindungen geeignete Kandidaten vorzuselektieren. Die Ergebnisse mussten einem reduzierten Pharmakophor entsprechen und die Kriterien in Tabelle 27 erfüllen. Der Pharmakophor bestand aus einer Wasserstoffbrückenakzeptor-Funktion zu Leu244 der *hinge*-Region und drei Wasserstoffbrückendonator-Funktionen zu Glu242, Asp250 und Asp325, sowie aus einem aromatischen Bereich im Zentrum der Bindetasche. Auch reaktive Strukturelemente wurden nach den Standardkriterien von MOE entfernt.

Tabelle 27: Filterkriterien für die Bewertung der verbundenen Fragmente.

Filter	Wert
Molekulare Masse [g/mol]	≤ 500
<i>Topological polar surface area</i> (TPSA)	40-140 Å ²
Anzahl rotierbarer Bindungen	≤ 8
Anzahl aromatischer Atome	≥ 6
Anzahl chiraler Zentren	≤ 4
Anzahl freier chiraler Zentren	≤ 3

Aus den Substanzen, die die beschriebenen Kriterien erfüllten, wurden vier Verbindungen als Ergänzung für die Template-Bibliothek der *fingerprint*-Suche verwendet (Tabelle 28).

Tabelle 28: Aus den Fragmenten entstandene Moleküle, die in der *fingerprint*-Suche eingesetzt wurden.

	Struktur
67	
68	
69	
70	

Die Moleküle der resultierenden Datenbank wurden in das *.sdf-Format umgewandelt, indem den Strukturen in Pipeline Pilot dreidimensionale Koordinaten und Wasserstoffatome hinzugefügt wurden, sowie eine Energieminimierung und eine Standardisierung durchgeführt wurde. Für die *fingerprint*-Suche wurde der FCFP4-*fingerprint* verwendet und ein Tanimoto-Koeffizient von mindestens 0.4 im Vergleich der Datenbank-Verbindung mit mindestens einer der Template-Verbindungen. Die resultierende Datenbank enthielt ca. 78,000 Strukturen im *.smi-Format und wurde in das *.sdf-Format konvertiert.

Pharmakophor-Suche

Um die aus der *fingerprint*-Suche erhaltene Datenbank in der Pharmakophor-Suche einsetzen zu können, wurden mit Hilfe der stochastischen Suche unter Standardeinstellungen in MOE Konformere für jedes Molekül generiert.

Das Pharmakophor-Modell wurde basierend auf der Kristallstruktur von DBH in CLK1 (PDB: 1Z57) entwickelt. Für die Lactam-Struktur wurden eine Akzeptor-Funktion an dem Sauerstoffatom und eine Donator-Funktion an dem Stickstoffatom hinzugefügt, sowie die komplementären Funktionen in der *hinge*-Region an Glu242 und Leu244. Die Funktionalitäten auf Seiten des Liganden wurden als essentiell festgelegt. Im Zentrum der ATP-Bindetasche wurde ein Volumen definiert, in dem sich ein Teil des Moleküls befinden muss, wobei dieser Teil zusätzlich ein aromatisches Strukturelement beinhalten muss. Im Bereich der α C-Helix wurde eine weitere Wasserstoffbrückendonator-Funktion hinzugefügt, um eine Interaktion potentieller Liganden mit Asp325 oder Glu206 zu ermöglichen. Als sterische Beschränkung für die Größe der Verbindungen wurde für die Aminosäuren, die die Bindetasche begrenzen, zudem ein gesperrter Bereich definiert. Die Pharmakophor-Suche wurde unter Standardbedingungen ausgeführt, wobei nur die jeweils am besten dem Pharmakophor-Modell entsprechende Konformation jeder Verbindung in die resultierende Datenbank aufgenommen wurde. Die resultierende Datenbank wurde im *.mdb-Format erhalten und für das anschließende *docking* in eine *.mol2-Datei umgewandelt.

10.4 Molekulares *docking*

Für die Durchführung der *docking* Studien wurden in der PDB-Datenbank⁵² veröffentlichte Kristallstrukturen der CLK-Isoformen CLK1-3 (PDB ID: 1Z57, 3NR9, 2WU7), sowie von PfCLK1 (PDB ID: 3LLT) und DYRK1A (PDB ID: 3ANQ) verwendet. Aus der Datenbank erhaltene *.pdb-Dateien wurden mit Hilfe des Programms MOE (*Molecular Operating Environment*)⁵³ für die weitere Verwendung vorbereitet. Zunächst wurden die in der *.pdb-Datei nicht enthaltenen Wasserstoffatome unter Beibehaltung der Standardparameter (u.a. pH-Wert: 7.4) ergänzt. Im Anschluss wurden die co-kristallisierten Inhibitor-Moleküle aus der Bindetasche entfernt, ebenso wie vorhandene Wassermoleküle. Die so vorbereiteten Kristallstrukturen wurden nach Konvertierung in das *.mol2-Format für das *docking* mit der Software GOLD⁵⁰ eingesetzt. Dreidimensionale Strukturen aller zu dockenden Liganden wurden in MOE

erstellt und einer Energieminimierung (Standardparameter) unterzogen, um eine realistische Ausgangskonformation gewährleisten zu können.

Die vorbereiteten Protein- und Liganden-Dateien wurden in das Programm GOLD geladen und in dieser Form für das *docking* verwendet. Mit Hilfe des ursprünglich co-kristallisierten Liganden wurden die Position und die Ausdehnung der zu verwendenden Bindetasche als Radius von 10 Å um den Liganden festgelegt. Als Bewertungsalgorithmus (*scoring function*) für die resultierenden Posen wurde *chemscore* eingesetzt, wobei zusätzlich ein speziell für Kinasen entwickeltes Parameter-Set verwendet wurde. Die frühzeitige Beendigung des *dockings*, auf Grund einer zu geringen Standardabweichung zwischen den erzeugten Posen, wurde deaktiviert (*allow early termination*). Um zusätzlich eine ausführliche Analyse möglicher Bindemodi vorzunehmen, wurden auch *docking*-Studien durchgeführt, in denen besonders vielseitige Posen erzeugt wurden (*generate divers solutions*). Insgesamt wurden pro Ligand, sofern nicht anders vermerkt, zehn Durchläufe des genetischen Algorithmus, auf dem das *docking* mit GOLD basierte, durchgeführt, wobei jeweils die zehn nach der *chemscore*-Funktion besten Posen gespeichert wurden. Es wurden keine von den einzelnen Posen zu erfüllenden Bedingungen gewählt (*constraints*), um das Ergebnis nicht zu beeinflussen. Mit der *docking accuracy* konnte die Ausführlichkeit der Posen-Generierung auf 200% festgelegt werden. Die Legitimität der gewählten Parameter wurde durch ein exemplarisches *redocking* des ursprünglich in 1Z57 co-kristallisierten Liganden bestätigt. In visueller Inspektion wurde die Qualität der gefundenen Bindemodi bewertet, indem die Anzahl ausgebildeter Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand, die Ausfüllung der Bindetasche, sowie die Ligandenkonformation als wichtigste Kriterien herangezogen wurden. Im Fall der weiteren modifizierbaren Parameter wurden die Standardeinstellungen beibehalten.

Die beschriebene Vorgehensweise wurde in gleicher Form auch in der Durchführung des virtuellen Screenings angewendet. Erhaltene *docking*-Posen wurden hinsichtlich ihrer Plausibilität bewertet, indem insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und die Positionierung des betrachteten Moleküls in der Bindetasche betrachtet wurden.

Sowohl Abbildungen zur Visualisierung der durch *docking* erzeugten, hypothetischen Bindemodi als auch Abbildungen experimentell bestimmter Kristallstrukturen wurden mit PyMol¹²⁰ oder MOE erzeugt.

Alle verwendeten Programme wurden auf einem Computer mit Windows 7 oder Linux Ubuntu als Betriebssystem verwendet.

10.5 Proteinkristallographie

Die Versuche zur Proteinkristallisation wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Stefan Knapp (*Nuffield Department of Clinical Medicine, Structural Genomics Consortium, University of Oxford, Großbritannien*) durchgeführt.

Proteinexpression und –reinigung

Das Plasmid, auf dem sich das CLK1-Gen kombiniert mit einem His-tag sowie Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin befand, wurde nach 30 minütiger Inkubation auf Eis durch einen Hitzeschock (42 °C, 45 s) in chemisch kompetente und Chloramphenicol-resistente *E. coli*-Zellen transformiert. In LB-Medium¹²¹ (100 µL, 50 g/L) wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Zur Selektion der Plasmid-haltigen *E. coli* Stämme wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigem Agar (10 mL; LB Medium (25 g/L), Agar (15 g/L), 10 µL Chloramphenicol (34 mg/mL), 10 µL Ampicillin (100 mg/mL)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmid-haltigen *E. coli* Stämme für eine Startkultur in LB-Medium (100 mL, 50 g/L; Chloramphenicol (100 µL, 34 mg/mL); Ampicillin (100 µL, 100 mg/mL)) selektiert und bei 37 °C für 16 h in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Startkultur (10 mL je Liter TB-Medium) wurde in Ampicillin-haltigem TB-Medium (*terrific broth*, 8 x 1 L; TARTOFF K. D. AND HOBBS C. A., 1987, IMPROVED MEDIA FOR GROWING PLASMID AND COSMID CLONES, BETHESDA RES. LAB. FOCUS, 9:12) für 3 h bei 37 °C und 190 rpm inkubiert bis die exponentielle Wachstumsphase, bestimmt durch Messung der optischen Dichte, erreicht wurde. Nach 1 h wurde die Inkubationstemperatur auf 18 °C reduziert und nach einer weiteren Stunde wurde die CLK1-Expression durch Zugabe von IPTG (500 µL, 1 M) induziert. Die Inkubation wurde über Nacht bei 18 °C und 180 rpm fortgesetzt. Im Folgenden wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C, 15 min) von dem Nährmedium abgetrennt, wobei die Zellmasse aus jeweils zwei Litern vereinigt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde diese bei -20 °C gelagert.

Zur Isolation des CLK1-Proteins wurden die Zellen zunächst in Binde-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, Glycerol 5%, 1 mM TCEP) unter Zusatz eines Protease-Inhibitors mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es wurde PEI hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 1.5% in der Suspension ergab um gelöste DNA auszufällen. Die präzipitierte DNA und die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation (23000 rpm, 10 °C, 25 min) von dem gelösten Protein abgetrennt. Zur Isolation des Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde der Überstand vollständig auf eine mit Binde-Puffer äquilibrierte Co-Sepharose-Säule (Länge: 2 cm, Durchmesser: 2.5 cm) gegeben. Um nicht gebundene Proteine zu eluieren wurde zunächst mit Binde-Puffer (175 mL) gewaschen, anschließend wurde die Imidazol-Konzentration schrittweise erhöht (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM; je 12 mL pro Fraktion), sodass das durch den His-tag gebundene CLK1-Protein eluiert wurde. Nach der gelelektrophoretischen Analyse der einzelnen Fraktionen wurden die produkthaltigen Fraktionen vereint und das Volumen durch Filtration (Porendurchmesser: 30 kD) unter Zentrifugation reduziert. Im Anschluss wurde die Imidazol-Konzentration durch Zugabe des Verdünnungs-Puffers (30 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 50 mM Arg/Glu (50/50), Glycerol 1%, 10 mM DTT) reduziert (25 mL, $c = 1.035 \text{ mg/mL}$ Protein, $c(\text{Imidazol}) < 30 \text{ mM}$). Durch Zugabe von TEV-Protease (TEV/Protein = 1/20) und Lagerung der Lösung über Nacht bei 4 °C wurde die His-tag-Spaltung vorgenommen. Nach erneuter Reduktion des Volumens (auf 5 mL) wurde eine affinitätschromatographische Reinigung an Ni-Sepharose (Länge: 2 cm, Durchmesser: 2.5 cm) durchgeführt, wobei vier Fraktionen nach Elution mit Elutionspuffer steigender Imidazol-Konzentration verwendet wurden (30 mM, 200 mM, 300 mM). Produkthaltige Fraktionen (nach SDS-PAGE) wurden vereint und das Volumen durch Filtration unter Zentrifugation reduziert (5 mL). In einem letzten Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie (Superdex S200) durchgeführt (Puffer: 30 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 50 mM Arg/Glu (50/50), 10 mM DTT, 1% Glycerol). CLK1 enthaltende Fraktionen (SDS-PAGE) wurden vereint und das Volumen reduziert, sodass sich eine finale Proteinkonzentration von 9.807 mg/mL ergab. Die gereinigte Protein-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

Die Expression und Reinigung von CLK3 verlief analog zu dem beschriebenen Verfahren. Abweichend wurde die Affinitätschromatographie in beiden Fällen mit Ni-Sepharose durchgeführt. Außerdem wurde die Protein-haltige Lösung für die Spaltung des His-tags in einem Dialysemembran-Schlauch über 12 h bei einer Temperatur von 4 °C in einem Dialyse-

Puffer inkubiert (Puffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 50 mM Arg/Glu (50/50), Glycerol (5%), 0.5 mM TCEP).

Kristallisation

Für die Co-Kristallisation von **17I** mit CLK1 wurde zunächst eine Mischung im molaren Verhältnis 4 zu 1 hergestellt (Ligand: 2 mM, Protein: 0.25 mM), wobei DMSO (4%) zur Verbesserung der Löslichkeit hinzugefügt wurde. Mit Hilfe der Methode des „sitzenden Tropfens“ (*sitting-drop vapour diffusion*) und einer Inkubation bei 4 °C konnten Ko-Kristallite gewonnen werden, die für die Vermessung mittels Röntgenstrahldiffraktometrie geeignet waren. Als Präzipitant wurde hierbei eine Mischung aus PEG (20%, PEG 3.35k) und Natriummalonat (0.1 mM) verwendet. Für die Co-Kristallisation von **54** mit CLK1 wurde das gleiche Verfahren angewendet. Abweichend bestand der Präzipitant aus 1,2-Propandiol (20%), Glycerol (10%), Dinatriumhydrogenphosphat (0.62 M) und Kaliumdihydrogenphosphat (0.38).

Für die Co-Kristallisation von **17a** mit CLK3 wurde das gleiche Verfahren angewendet. Der Präzipitant bestand aus PEG (21%, PEG 3350), Natriumiodid (0.2 M), 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propan (0.1 M, pH 7) und Ethylenglycol (10%).

Datensammlung und Strukturbestimmung

Zu den gewachsenen Protein-Ligand-Co-Kristalliten aus CLK1 und **17I** wurde zu der Präzipitantenlösung Ethylenglycol als Kryoprotektion hinzugefügt (25%), sodass das Einfrieren mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zerstörungsfrei möglich war. Bis zur Vermessung wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Beugungsdaten wurden durch Synchrotron-Strahlung (Diamond Light Source-Beamlines; Didcot, Oxfordshire, UK) erhalten.

Co-Kristallstruktur von CLK1 mit **17I**: Diamond Light Source-Beamline I04, Detektor: Pilatus 6M-F, Wellenlänge: 0.97949 Å.

Co-Kristallstruktur von CLK1 mit **54I**: Diamond Light Source-Beamline I03, Detektor: Pilatus3 6M, Wellenlänge: 0.97625 Å.

Co-Kristallstruktur von CLK3 mit **17a**: Diamond Light Source-Beamline I02, Detektor: Pilatus 6M, Wellenlänge: 0.9795 Å.

Mit dem Programm MOSFLM¹²² wurde aus dem erhaltenen Beugungsmuster zunächst die Elementarzelle (*unit cell*) bestimmt und eine Integration der Punkte im Beugungsmuster durchgeführt. Im Anschluss wurde mit AIMLESS¹²³ eine Skalierung der Intensitäten für mehrfach bestimmte Punkte vorgenommen. Für die Erstellung eines ersten Modells mit dem Programm PHASER¹²⁴ wurde die Methode des *molecular replacements* verwendet, bei der zunächst die Phasendaten eines bereits vollständigen Modells mit den Intensitäten und Frequenzen des neuen Experiments kombiniert werden. Anschließend wurde eine iterative Verfeinerung (*refinement*) des Modells mit Hilfe von REFMAC¹²⁵ und COOT¹²⁶ durchgeführt. Die Programme AIMLESS, PHASER und REFMAC wurden als Bestandteil des CCP4-Paketes¹²⁷ angewendet. Das finale Modell wurde mit MolProbity¹²⁸ auf geometrische Richtigkeit hin überprüft.

Strukturdaten der Co-Kristallstruktur von Verbindung **17I** in CLK1

Tabelle 29: Prozessierungsdaten für die Co-Kristallstruktur von Verbindung **17I** in CLK1.

	<i>Overall</i>	<i>InnerShell</i>	<i>OuterShell</i>
Low resolution limit [Å]	23.65	23.65	1.53
High resolution limit [Å]	1.45	4.59	1.45
R_{merge} (within I+/I-)	0.044	0.031	0.381
R_{merge} (all I+ & I-)	0.047	0.033	0.427
R_{meas} (within I+/I-)	0.061	0.043	0.514
R_{meas} (all I+ & I-)	0.057	0.040	0.522
R_{pim} (within I+/I-)	0.041	0.030	0.343
R_{pim} (all I+ & I-)	0.032	0.022	0.296
R_{merge} in top intensity bin	0.030	-	-
Total number of observations	214486	6974	29518
Total number unique	71117	2313	10186
Mean ((I)/sd(I))	9.9	24.2	2.2
Completeness [%]	99.1	98.9	97.5
Multiplicity	3.0	3.0	2.9
Anomalous	83.3	88.8	75.3

	<i>Overall</i>	<i>InnerShell</i>	<i>OuterShell</i>
completeness [%]			
Anomalous multiplicity	1.3	1.6	1.5
DelAnom correlation between half-sets	-0.216	-0.062	-0.003
Mid-slope of anom normal probability	0.813	-	-

Outlier rejection and statistics assume that there is no anomalous scattering.

Tabelle 30: Kristalldaten.

Average unit cell	a = 91.64 Å, b = 64.21 Å, c = 88.36 Å (α = 90.00 Å, β = 127.67 Å, γ = 90.00 Å)
Space group	C 1 2 1
Average mosaicity	0.36
Minimum and maximum SD correction factors	Fulls: 0.00, 0.00 Partials: 0.20, 84.50

Verfeinerungsdaten für Verbindung 17I

Tabelle 31: *R-factor analysis, stats vs. Cycle.*

	N
GRAPHS: R-factor vs. cycle	1, 2, 3
FOM vs. cycle	1, 4
-LL vs. Cycle	1, 5
-LLfree vs. cycle	1, 6
Geometry vs. cycle	1, 7, 8, 9, 10, 11

Tabelle 32: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17l** (Teil 1).

<i>N_{cyc}</i>	<i>R_{fact}</i>	<i>R_{free}</i>	<i>FOM</i>	<i>-LL</i>	<i>-LL_{free}</i>
0	0.1774	0.2081	0.847	316107	16625
1	0.1760	0.2068	0.846	315869	16617
2	0.1753	0.2063	0.847	315714	16612
3	0.1751	0.2060	0.847	315704	16612
4	0.1750	0.2060	0.847	315740	16613
5	0.1750	0.2060	0.847	315770	16615
6	0.1750	0.2060	0.847	315775	16615
7	0.1750	0.2059	0.847	315787	16616
8	0.1750	0.2060	0.847	315787	16616
9	0.1750	0.2060	0.846	315854	16619
10	0.1750	0.2059	0.846	315879	16620.3
11	0.1683	0.2015	0.852	313152	16508.9
12	0.1665	0.1985	0.855	312417	16463.8
13	0.1660	0.1978	0.855	312085	16444.8
14	0.1660	0.1969	0.856	312057	16438.3
15	0.1651	0.1967	0.857	311728	16426.7
16	0.1646	0.1959	0.857	311557	16418.7
17	0.1645	0.1956	0.857	311514	16415.6
18	0.1643	0.1955	0.858	311390	16408.4
19	0.1642	0.1954	0.857	311346	16407.2
20	0.1641	0.1953	0.858	311303	16404.9

Tabelle 33: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17l** (Teil 2).

<i>Ncyc</i>	<i>Rfact</i>	<i>Rfree</i>	<i>FOM</i>	<i>-LL</i>	<i>-LLfree</i>
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0205	1.103	1.928	0.943	0.133
11	0.0165	0.841	1.714	0.828	0.112
12	0.0159	0.813	1.698	0.820	0.111
13	0.0160	0.821	1.697	0.821	0.111
14	0.0161	0.827	1.701	0.823	0.111
15	0.0159	0.817	1.691	0.819	0.111
16	0.0157	0.806	1.684	0.815	0.111
17	0.0156	0.797	1.680	0.813	0.111
18	0.0156	0.795	1.678	0.813	0.111
19	0.0155	0.793	1.676	0.812	0.111
20	0.0155	0.792	1.675	0.812	0.111

Tabelle 34: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17l** (Teil 3).

	<i>Initial results</i>	<i>Final results</i>
R factor	0.1774	0.1641
R free	0.2081	0.1953
Rms BondLength	0.0205	0.0155
Rms BondAngle	1.9277	1.6753
Rms ChirVolume	0.1326	0.1110

Strukturdaten der Co-Kristallstruktur von Verbindung 54 in CLK1**Tabelle 35:** Prozessierungsdaten für die Co-Kristallstruktur von Verbindung 54 in CLK1.

	<i>Overall</i>	<i>InnerShell</i>	<i>OuterShell</i>
Low resolution limit [Å]	29.11	29.11	1.97
High resolution limit [Å]	1.87	5.91	1.87
R_{merge}	0.083	0.047	0.738
R_{merge} in top intensity bin	0.046	-	-
R_{meas} (within I+/I-)	0.092	0.052	0.824
R_{meas} (all I+ & I-)	0.092	0.052	0.824
R_{pim} (within I+/I-)	0.040	0.022	0.362
R_{pim} (all I+ & I-)	0.040	0.022	0.362
Fractional partial bias	-0.027	-0.025	-0.084
Total number of observations	495928	16066	70253
Total number unique	95883	3096	13962
Mean ((I)/sd(I))	9.9	24.6	2.0
Mn(I) half-set correlation CC(1/2)	0.997	0.998	0.717
Completeness [%]	100.0	99.2	100.0
Multiplicity	5.2	5.2	5.0
Anomalous completeness [%]	97.8	98.6	96.8
Anomalous multiplicity	2.6	2.7	2.5
DelAnom correlation between half-sets	-0.187	-0.100	-0.015
Mid-slope of anom normal probability	0.890	-	-

Outlier rejection and statistics assume that there is no anomalous scattering.

Tabelle 36: Kristalldaten.

Average unit cell	$a = 56.40 \text{ \AA}$, $b = 116.30 \text{ \AA}$, $c = 91.33 \text{ \AA}$ ($\alpha = 90.00 \text{ \AA}$, $\beta = 98.98 \text{ \AA}$, $\gamma = 90.00 \text{ \AA}$)
Space group	P 1 2 1 1
Average mosaicity	0.30
Minimum and maximum SD correction factors	Partials: 0.19, 34.65

Verfeinerungsdaten für Verbindung 54**Tabelle 37:** *R-factor analysis, stats vs. Cycle.*

	N
GRAPHS:R-factor vs. cycle	1, 2, 3
FOM vs. cycle	1, 4
-LL vs. Cycle	1, 5
-LLfree vs. cycle	1, 6
Geometry vs. cycle	1, 7, 8, 9, 10, 11

Tabelle 38: Verfeinerungsdaten für Verbindung **56** (Teil 1).

<i>Ncyc</i>	<i>Rfact</i>	<i>Rfree</i>	<i>FOM</i>	<i>-LL</i>	<i>-LLfree</i>
0	0.2640	0.2813	0.729	473093	24858
1	0.2401	0.2615	0.754	465598	24523
2	0.2291	0.2525	0.769	461089	24321
3	0.2238	0.2483	0.774	458695	24216
4	0.2216	0.2467	0.776	457813	24180
5	0.2205	0.2460	0.778	457431	24164
6	0.2200	0.2457	0.778	457240	24157
7	0.2198	0.2456	0.779	456912	24144
8	0.2197	0.2456	0.779	456901	24144
9	0.2197	0.2457	0.779	456819	24140
10	0.2197	0.2458	0.779	456822	24140.7
11	0.1830	0.2211	0.811	441844	23603.6
12	0.1741	0.2122	0.827	436888	23376.1
13	0.1703	0.2074	0.833	434563	23260.7
14	0.1686	0.2050	0.837	433448	23196.3
15	0.1680	0.2037	0.838	432663	23151.8
16	0.1673	0.2031	0.840	432142	23122.4
17	0.1669	0.2022	0.840	431808	23100.2
18	0.1667	0.2020	0.841	431650	23089.9
19	0.1665	0.2014	0.841	431519	23080.4
20	0.1664	0.2017	0.841	431521	23079.7

Tabelle 39: Verfeinerungsdaten für Verbindung **54** (Teil 2).

<i>Ncyc</i>	<i>rmsBOND</i>	<i>zBOND</i>	<i>rmsANGL</i>	<i>zANGL</i>	<i>rmsCHIRAL</i>
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0195	1.106	1.658	0.789	0.104
11	0.0234	1.198	1.778	0.846	0.119
12	0.0184	0.940	1.672	0.789	0.106
13	0.0175	0.892	1.643	0.776	0.103
14	0.0169	0.861	1.618	0.766	0.101
15	0.0167	0.849	1.608	0.763	0.100
16	0.0165	0.840	1.597	0.759	0.100
17	0.0164	0.835	1.595	0.758	0.100
18	0.0163	0.832	1.588	0.756	0.099
19	0.0163	0.831	1.590	0.757	0.099
20	0.0163	0.830	1.584	0.756	0.099

Tabelle 40: Verfeinerungsdaten für Verbindung **54** (Teil 3).

	<i>Initial results</i>	<i>Final results</i>
R factor	0.2640	0.1664
R free	0.2813	0.2017
Rms BondLength	0.0195	0.0163
Rms BondAngle	1.6579	1.5842
Rms ChirVolume	0.1042	0.0993

Strukturdaten der Co-Kristallstruktur von Verbindung **17a** in CLK3**Tabelle 41:** Prozessierungsdaten für die Co-Kristallstruktur von Verbindung **17a** in CLK3.

	<i>Overall</i>	<i>InnerShell</i>	<i>OuterShell</i>
Low resolution limit [Å]	59.94	59.94	2.13
High resolution limit [Å]	2.02	6.39	2.02
R_{merge}	0.091	0.044	0.668
R_{merge} in top intensity bin	0.045	-	-
R_{meas} (within I+/I-)	0.106	0.052	0.785
R_{meas} (all I+ & I-)	0.106	0.052	0.785
R_{pim} (within I+/I-)	0.054	0.027	0.404
R_{pim} (all I+ & I-)	0.054	0.027	0.404
Fractional partial bias	-0.041	-0.043	-0.049
Total number of observations	230632	7414	32663
Total number unique	62659	2035	9103
Mean ((I)/sd(I))	8.0	18.9	2.1
Completeness [%]	96.7	96.6	96.0
Multiplicity	3.7	3.6	3.6
Anomalous completeness [%]	82.3	80.8	81.1
Anomalous multiplicity	2.0	2.1	1.9
DelAnom correlation between half-sets	-0.024	0.014	-0.009
Mid-slope of anom normal probability	0.931	-	-

Outlier rejection and statistics assume that there is no anomalous scattering.

Tabelle 42: Kristalldaten.

Average unit cell	$a = 61.76 \text{ \AA}$, $b = 116.83 \text{ \AA}$, $c = 69.91 \text{ \AA}$ ($\alpha = 90.00 \text{ \AA}$, $\beta = 92.75 \text{ \AA}$, $\gamma = 90.00 \text{ \AA}$)
Space group	P 1 21 1
Average mosaicity	0.27
Minimum and maximum SD correction factors	Partials: 0.19, 109.38

Verfeinerungsdaten für Verbindung **17a****Tabelle 43:** *R-factor analysis, stats vs. Cycle.*

	N
GRAPHS: R-factor vs. cycle	1, 2, 3
FOM vs. cycle	1, 4
-LL vs. Cycle	1, 5
-LLfree vs. cycle	1, 6
Geometry vs. cycle	1, 7, 8, 9, 10, 11

Tabelle 44: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17a** (Teil 1).

<i>Ncyc</i>	<i>Rfact</i>	<i>Rfree</i>	<i>FOM</i>	<i>-LL</i>	<i>-LLfree</i>
0	0.2408	0.2709	0.768	300146	16407.3
1	0.2283	0.2610	0.776	298035	16318.0
2	0.2233	0.2571	0.784	297033	16276.6
3	0.2218	0.2560	0.787	296752	16266.2
4	0.2207	0.2552	0.789	296536	16257.4
5	0.2198	0.2545	0.791	296343	16249.6
6	0.2191	0.2539	0.793	296198	16243.6
7	0.2186	0.2536	0.794	296078	16239.2
8	0.2182	0.2533	0.796	295978	16234.9
9	0.2180	0.2531	0.796	295902	16231.9
10	0.2177	0.2531	0.797	295842	16229.9
11	0.2089	0.2473	0.807	294037	16173.8
12	0.1982	0.2420	0.819	291687	16104.5
13	0.1970	0.2401	0.823	291444	16088.1
14	0.1946	0.2380	0.828	290832	16065.0
15	0.1943	0.2376	0.828	290780	16057.4
16	0.1928	0.2365	0.831	290407	16046.2
17	0.1929	0.2364	0.831	290437	16042.7
18	0.1919	0.2355	0.833	290164	16036.9
19	0.1921	0.2355	0.833	290213	16035.3
20	0.1917	0.2352	0.833	290145	16037.7

Tabelle 45: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17a** (Teil 2).

<i>Ncyc</i>	<i>rmsBOND</i>	<i>zBOND</i>	<i>rmsANGL</i>	<i>zANGL</i>	<i>rmsCHIRAL</i>
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0183	0.995	1.795	0.867	0.111
11	0.0159	0.823	1.683	0.804	0.103
12	0.0159	0.797	1.656	0.787	0.100
13	0.0155	0.776	1.641	0.780	0.099
14	0.0152	0.762	1.629	0.773	0.098
15	0.0151	0.757	1.623	0.771	0.098
16	0.0151	0.753	1.617	0.768	0.098
17	0.0150	0.750	1.614	0.766	0.098
18	0.0150	0.748	1.611	0.764	0.098
19	0.0149	0.747	1.610	0.764	0.098
20	0.0149	0.746	1.609	0.763	0.098

Tabelle 46: Verfeinerungsdaten für Verbindung **17a** (Teil 3).

	<i>Initial results</i>	<i>Final results</i>
R factor	0.2408	0.1917
R free	0.2709	0.2352
Rms BondLength	0.0183	0.0149
Rms BondAngle	1.7954	1.6085
Rms ChirVolume	0.1108	0.0979

10.6 Verfahren zur Testung der biologischen Aktivität

In vitro-Bestimmung der Proteinkinase-inhibitorischen Aktivität

Alle auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersuchten Verbindungen wurden nach publizierten Methoden von Laurent Meijer (Station Biologique, Roscoff, Frankreich) an den entsprechenden Proteinkinasen getestet. Es wurde die hemmende Wirkung auf folgende Kinasen der CMGC-Gruppe untersucht:

CDK1/Cyclin B, CDK2/CyclinA, CDK5/p25, CDK9/Cyclin T, CK1, CLK1-4, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und GSK3 α/β .

Die Phosphorylierungsaktivität der Kinasen wurde evaluiert, indem die Übertragung eines [γ - ^{33}P]-Phosphat-Rests von radioaktiv markiertem [γ - ^{33}P]-ATP auf ein spezifisches Substrat radiometrisch gemessen wurde. Die Verbindungen wurden als DMSO-Lösung einem Puffer zugesetzt, der die jeweilige Kinase, deren Substrat sowie [γ - ^{33}P]-ATP enthielt (finale DMSO-Konzentration: 1%). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30 °C wurden 25 μL der Lösung auf Whatman P81 Phosphocellulose Papier (ca. 2.5 x 3 cm) gegeben und die Reaktion gestoppt, indem fünfmal für 5 min mit 1-prozentiger Phosphorsäure gewaschen wurde. Danach wurden die Papiere im nassen Zustand mit 1 mL ACS (Amersham) Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivitäten bestimmt, die sich proportional zu dem inkorporierten [γ - ^{33}P]-Phosphat verhalten. Nach Abzug der Blindwerte wurde die Kinaseaktivität als prozentualer Anteil der maximalen Enzymaktivität (Positivkontrolle) in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration angegeben. Aus den entstandenen Dosis-Wirkungskurven konnten die IC_{50} -Werte der jeweiligen Verbindungen bei einer Enzymaktivität von 50% entnommen werden. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. In jeder Verdünnungsreihe wurden zusätzlich eine Positivkontrolle (DMSO ohne Inhibitor) und eine Negativkontrolle (ohne Enzym) vermessen.^{129, 130}

CDK1/Cyclin B

Die Kinase wurde aus Oocyten des Seesterns *Marthasteria glacialis*, die sich in der M-Phase des Zellcyclus befanden, extrahiert. Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie, indem das Enzym zunächst an p9CKShs1-Sepharose-Kügelchen gebunden und danach mit freiem p9CKShs1 eluiert und isoliert wurde. Die Kinaseaktivität wurde in Kinasepuffer C mit 1 mg/mL Histon H1 als Substrat und 15 μL [γ - ^{33}P]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL) in einem

Gesamtvolumen von 30 μL bestimmt. Ein Aliquot von 25 μL wurde wie oben beschrieben für die Messung verwendet.¹³¹

Kinasepuffer C: 60 mM β -Glycerophosphat, 15 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 25 mM MOPS (3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure, pH 7.2), 5 mM EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure), 15 mM MgCl_2 , 1 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM Natriumvanadat, 1 mM Phenylphosphat.

CDK2/Cyclin A

CDK2/Cyclin A wurde aus gleichen Teilen rekombinanter Säuger-CDK2 und Cyclin A hergestellt. Der Komplex wurde durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert und gereinigt.¹³² Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B.

CDK5/p25

CDK5/p25 wurde aus gleichen Teilen rekombinanter Säuger-CDK5 und Protein p25 hergestellt. Bei dem Protein p25 handelt es sich um eine verkürzte Version von p35, dem 35 kDa schweren, regulatorischen Protein von CDK5. Es wurde in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Aufreinigung fand analog zu CDK2/Cyclin A über Affinitätschromatographie an Glutathion statt, während die Bestimmung der Kinaseaktivität analog zu CDK1/Cyclin B erfolgte.¹³⁰

CDK9/Cyclin T

Die humane rekombinante Proteinkinase CDK9/Cyclin T wurde in Insektenzellen exprimiert, welche zuvor mit dem Baculovirus infiziert worden waren. Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde ein pRB-Fragment (Aminosäuren 773-928, 3.5 μg pro Assay) als Substrat verwendet. Ansonsten entsprach die Durchführung der für CDK1/Cyclin B beschriebenen.¹³¹

CK1

Die Kinase CK1 wurde aus homogenisiertem Schweinehirn isoliert. Es folgte eine affinitätschromatographische Reinigung an Agarose mit immobilisiertem GST-Axin. Die Kinaseaktivität wurde, abweichend von CDK1/Cyclin B, in dreifach verdünntem Kinasepuffer C und in Gegenwart von 25 μM eines CK1-spezifischen Substrats (RRKHAAIGpSAYSITA) bestimmt.¹³¹

GSK-3 α / β

Die Kinasen GSK-3 α / β (GSK-3 α : human, GSK-3 β : rekombinant) wurden aus Schweinehirn mittels Affinitätschromatographie an Agarose unter Verwendung von immobilisiertem Axin-(His)₆ isoliert und gereinigt.¹³³ Die Kinaseaktivität wurde in Kinasepuffer A mit 40 μ M GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQpSEDEEE) als Substrat und 15 μ M [γ -³³P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) in einem finalen Volumen von 30 μ L bestimmt. Ein Aliquot von 25 μ L wurde wie oben beschrieben für die Messung verwendet.¹³⁴

Kinasepuffer A: 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure), 1 mM DTT (Dithiothreitol), 25 mM Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid, pH 7.5) und 50 μ g Heparin/mL.

DYRK1A/1B/2/3

DYRK1A (human und aus der Ratte), DYRK1B, DYRK2 und DYRK3 wurden in *E. coli* als rekombinante GST-Fusionsproteine exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose gereinigt. Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde Woodtide (KKISGRSLPIMTEQ, 1.5 μ g pro Assay) als Substrat verwendet. Die Durchführung erfolgte analog zu GSK-3 α / β unter Zusatz von 0.5 mg BSA pro Mililiter.¹³⁵

Die native DYRK1A konnte aus dem Gehirn der Ratte isoliert werden und im Anschluss unter Verwendung einer auf der C-terminalen Domäne natürlich vorkommenden Poly-Histidin-Sequenz durch Affinitätschromatographie an Cobalt-Sepharose-Kügelchen (Clontech) gereinigt werden. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte analog zu CDK1/Cyclin B, wobei basisches Myelinprotein als Substrat verwendet wurde.¹³¹

Humane DYRK1A wurde in Insektenzellen exprimiert, die zuvor mit Baculoviren infiziert wurden. Das DYRK1A-Gen wurde in einem Vektorplasmid (pGTP-B-302) in Sf9-Zellen transfiziert und als Fusionsprotein mit einem (His)₆-tag exprimiert. Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie an Ni-NTA (Nitrilotriessigsäure) und Elution durch Imidazol.

CLK1-4

CLK1-4 wurden als murine rekombinante Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose isoliert. Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde Kinasepuffer A unter Zusatz von BSA (0.15 mg/mL) und RS-Protein (GRSRSRSRSR, 1 μ g pro Assay) als Substrat verwendet.¹³⁵

10.7 Differentielle Scanning Fluorimetrie

Von den zu testenden Verbindungen wurde eine Stammlösung in DMSO hergestellt (50 mM), die zu den gewünschten Konzentrationen mit DMSO verdünnt wurde (5 mM, 0.5 mM). Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert. Die jeweilige Protein-Stammlösung wurde mit DSF-Puffer (10 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl) zu einer Konzentration von 2 µM verdünnt. Als fluoreszierender Indikator wurde Sypro®Orange (4 µL/mL Protein-Lösung) hinzugefügt. Die Untersuchung wurde mit 96-well-Platten durchgeführt, wobei pro well 20 µL Protein-Farbstoff-Lösung mit 0.4 µL Testsubstanz-Lösung gemischt wurden. Nach dem Versiegeln der Platte wurde zentrifugiert (1000 rpm, 1 min) und anschließend sofort die Bestimmung der Schmelztemperatur mit dem Strategene Mx3005P rtPCR-System durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism.

Proteinexpression und -reinigung

SRPK1

Das Plasmid, auf dem sich das SRPK1-Gen kombiniert mit einem His-tag sowie Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin befand, wurde nach 30 minütiger Inkubation auf Eis, durch einen Hitzeschock (42 °C, 45 s) in BL21(DE3)R3-pRARE2-Zellen transformiert. In LB-Medium¹²¹ (100 µL, 50 g/L) wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Zur Selektion der Plasmidhaltigen *E. coli* Stämme wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigem Agar (10 mL; LB-Medium (25 g/L), Agar (15 g/L), 10 µL Chloramphenicol (34 mg/mL), 10 µL Kanamycin (50 mg/mL)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmidhaltigen *E. coli* Stämme für eine Startkultur in LB-Medium (100 mL, 50 g/L; Chloramphenicol (100 µL, 34 mg/mL); Kanamycin (100 µL, 50 mg/mL)) selektiert und bei 37 °C für 16 h in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Startkultur (10 mL je 800 mL LB-Medium) wurde in Kanamycin-haltigem LB-Medium (Kanamycin 35 µg/mL) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert bis eine optischen Dichte von 0.4-0.5 erreicht wurde. Nachdem eine optische Dichte von 0.6 erreicht wurde, wurde die Inkubationstemperatur auf 18 °C reduziert und die SRPK1-Expression durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) induziert. Die Inkubation wurde über Nacht bei 18 °C und 180 rpm fortgesetzt. Im Folgenden wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 15 min) von dem Nährmedium abgetrennt, wobei die Zellmasse aus jeweils zwei Litern vereinigt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde diese bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation des SRPK1-Proteins wurden die Zellen zunächst in Binde-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, Glycerol 5%, 0.5 mM TCEP) unter Zusatz eines Protease-Inhibitors mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es wurde PEI hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 0.15% in der Suspension ergab um gelöste DNA auszufällen. Die präzipitierte DNA und die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation (21000 rpm, 4 °C, 30 min) von dem gelösten Protein abgetrennt. Zur Isolation des Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde der Überstand vollständig auf eine mit Binde-Puffer äquilibrierte Ni-Sepharose-Säule (Länge: 2 cm, Durchmesser: 2 cm) gegeben. Um nicht gebundene Proteine zu eluieren wurde zunächst mit Binde-Puffer (50 mL) und mit modifiziertem Bindepuffer (1 M NaCl, 50 mL) gewaschen, anschließend wurde die Imidazol-Konzentration schrittweise erhöht (30 mM, 50 mL; 500 mM, 25 mL), sodass das durch den His-tag gebundene SRPK1-Protein eluiert wurde. Nach der gelelektrophoretischen Analyse der einzelnen Fraktionen wurden die produkthaltigen Fraktionen vereint und das Volumen durch Filtration unter Zentrifugation reduziert. Durch Zugabe von TEV-Protease (TEV/Protein = 1/25) und Lagerung der Lösung über Nacht bei 4 °C wurde die His-tag-Spaltung vorgenommen. Im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie (Superdex S75) durchgeführt (Gelfiltrationspuffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glycerol, 0.5 mM TCEP). Mit den vereinten Protein-haltigen Fraktionen wurde eine erneute affinitätschromatographische Reinigung an Ni-Sepharose (Länge: 2 cm, Durchmesser: 2 cm) durchgeführt, wobei sechs Fraktionen nach Elution mit Gelfiltrationspuffer steigender Imidazol-Konzentration erhalten wurden (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, je ca. 100 mL; 1 M, 50 mL). Produkthaltige Fraktionen (nach SDS-PAGE) wurden vereint und das Volumen durch Filtration unter Zentrifugation reduziert, sodass sich eine finale Proteinkonzentration von 16.0 mg/mL ergab. Die gereinigte Protein-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

SRPK2

Das Plasmid, auf dem sich das SRPK2-Gen kombiniert mit einem His-tag sowie Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin befand, wurde nach 30 minütiger Inkubation auf Eis durch einen Hitzeschock (42 °C, 45 s) in BL21(DE3)R3-pRARE2-Zellen transformiert. In LB-Medium¹²¹ (100 µL, 50 g/L) wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert. Zur Selektion der Plasmid-haltigen *E. coli* Stämme wurden die Bakterien auf Antibiotika-haltigem Agar (10 mL; LB Medium (25 g/L), Agar (15 g/L), 10 µL Chloramphenicol (34 mg/mL), 10 µL Kanamycin (50 mg/mL)) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Plasmid-haltigen *E. coli*

Stämme für eine Startkultur in LB-Medium (50 mL, 50 g/L; Chloramphenicol (100 µL, 34 mg/mL); Kanamycin (100 µL, 50 mg/mL)) selektiert und bei 37 °C für 16 h in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Startkultur (10 mL je 1000 mL LB-Medium) wurde in Kanamycin-haltigem LB-Medium (Kanamycin 35 µg/mL) bei 37 °C und 160 rpm inkubiert bis eine optischen Dichte von 0.4-0.5 erreicht wurde. Nachdem eine optische Dichte von 0.6 erreicht wurde, wurde die Inkubationstemperatur auf 20 °C reduziert und die SRPK1-Expression durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) induziert. Die Inkubation wurde über Nacht bei 20 °C und 160 rpm fortgesetzt. Im Folgenden wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 15 min) von dem Nährmedium abgetrennt, wobei die Zellmasse aus jeweils zwei Litern vereinigt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde diese bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation des SRPK2-Proteins wurden die Zellen zunächst in Binde-Puffer (50 mM HEPES pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, Glycerol 5%, 0.5 mM TCEP, 0.2 mM PMSF) unter Zusatz eines Protease-Inhibitors mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es wurde PEI hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 0.15% in der Suspension ergab um gelöste DNA auszufällen. Die präzipitierte DNA und die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation (21000 rpm, 4 °C, 15 min) von dem gelösten Protein abgetrennt. Zur Isolation des Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde der Überstand vollständig auf eine mit Binde-Puffer äquilibrierte Ni-Sepharose-Säule (Länge: 1 cm, Durchmesser: 2 cm) gegeben. Um nicht gebundene Proteine zu eluieren wurde zunächst mit Binde-Puffer (50 mL) gewaschen, anschließend wurde die Imidazol-Konzentration schrittweise erhöht (40 mM, 1 M NaCl, 50 mL; 60 mM, 50 mL; 250 mM, 25 mL), sodass das durch den His-tag gebundene CLK1-Protein eluiert wurde. Nach der gelelektrophoretischen Analyse der einzelnen Fraktionen wurden die produkthaltigen Fraktionen vereint und das Volumen durch Filtration unter Zentrifugation reduziert. Durch Zugabe von TEV-Protease (TEV/Protein = 1/25) und Lagerung der Lösung über Nacht bei 4 °C wurde die His-tag-Spaltung vorgenommen. Im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie (Superdex S200) durchgeführt (Gelfiltrationspuffer: 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% Glycerol, 0.5 mM TCEP). Mit den vereinten Protein-haltigen Fraktionen wurde eine erneute affinitätschromatographische Reinigung an Ni-Sepharose (Länge: 2 cm, Durchmesser: 2 cm) durchgeführt, wobei sechs Fraktionen nach Elution mit Gelfiltrationspuffer steigender Imidazol-Konzentration erhalten wurden (10 mM, 20 mM, 30 mM, 250 mM). Produkthaltige Fraktionen (nach SDS-PAGE) wurden vereint und das Volumen durch Filtration unter Zentrifugation reduziert, sodass sich

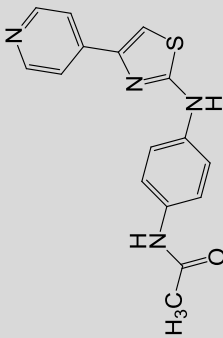
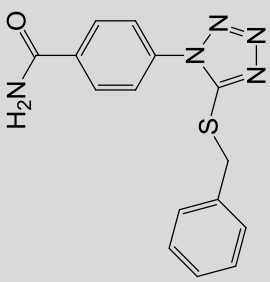
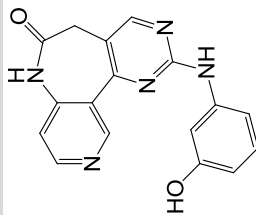
eine finale Proteinkonzentration von 9.39 mg/mL ergab. Die gereinigte Protein-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

CLK1

Die Expression und Reinigung von CLK1 erfolgte analog zu der unter 10.5 beschriebenen Methode.

10.8 Anhang: Tabellen mit biologischen Daten

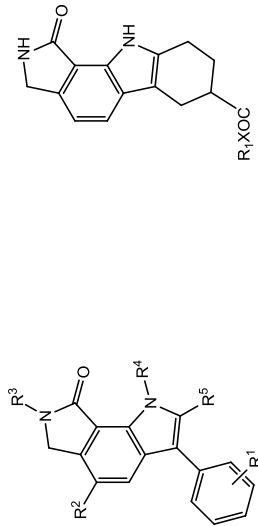
Tabelle 47: Ergebnisse der biologischen Testung der aus dem virtuellen Screening resultierten Substanzen.

		IC ₅₀ Werte [µM]							
ZINC ID	Struktur	CDK1	CDK2/A	CDK5	CDK9/ cyclinT	CK1	CLK1	DYRK1A	GSK3
20a		> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	4.1	3.2	> 10
63		> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
64		3.2	2.3	4.3	> 10	2.2	> 10	> 10	> 10

[illegible]

[illegible]

Tabelle 49: IC₅₀-Werte [μM] für die Inhibition von Kinasen der CLK- und der DYRK-Familie durch 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-g]indol-8(1*H*)-one, sowie durch 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure **60** und dessen Methylester **61**.



17a-l, 40a, 43, 22b-e,
21a-e, 50a, 54

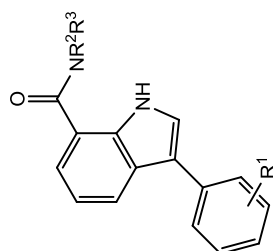
60 X = O
61 X = N

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	DYRK1A	DYRK1B	DYRK2	DYRK3
17a	H	H	H	H	H	0.046	0.210	> 10	0.120	> 10	4.8	0.720	> 10
17b	3,4-Cl	H	H	H	H	0.110	0.690	> 10	0.130	> 10	> 10	> 10	> 10
17c	3-Cl	H	H	H	H	0.088	0.510	> 10	0.028	> 10	> 10	> 10	> 10
17d	4-Cl	H	H	H	H	0.100	0.170	1.8	0.130	> 10	> 10	9.3	> 10
17e	3-CH ₃	H	H	H	H	0.061	0.410	5.1	0.140	2.6	4.1	3.1	> 10
17f	H	H	H	H	CH ₃	0.093	nd	nd	nd	1.5	nd	nd	nd
17g	H	H	H	H	C ₂ H ₅	0.120	nd	nd	nd	0.810	nd	nd	nd
17h	H	H	CH ₃	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17i	3-OCH ₃	H	H	H	H	0.110	0.320	2.8	0.110	3.8	1.9	2.1	5.4
17j	3-NO ₃	H	H	H	H	0.038	0.370	8.5	0.061	> 10	1.5	4.9	1.9
17k	2-Cl	H	H	H	H	0.140	nd	nd	nd	1.100	nd	nd	nd
17l	3-OH	H	H	H	H	0.044	0.082	1.7	0.081	0.740	0.390	0.590	2.2

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	CLK1	CLK2	CLK3	CLK4	DYRK1A	DYRK1B	DYRK2	DYRK3
21a	H	Br	H	H	H	0.043	nd	nd	nd	0.2	nd	nd	nd
21b	H	Cl	H	H	H	0.38	0.033	2.2	0.3	0.32	1.8	2.3	> 10
21c	H	Phe	H	H	H	8.8	7.2	> 10	1.3	> 10	> 10	> 10	> 10
21d	H	2-F-Phe	H	H	H	5.8	4.1	> 10	0.910	> 10	> 10	> 10	> 10
21e	H	3-F-Phe	H	H	H	7.2	> 10	> 10	3.2	> 10	> 10	> 10	> 10
22a	H	H	H	CH ₃	H	0.190	1.1	> 10	0.160	> 10	> 10	> 10	> 10
22b	H	H	H	C ₂ H ₅	H	0.380	nd	nd	nd	3.9	nd	nd	nd
22c	H	H	H	CH ₂ COOC ₂ H ₅	H	> 10	nd	nd	nd	> 10	nd	nd	nd
22d	H	H	H	CH ₂ CONH ₂	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
22e	H	H	CH ₃	CH ₃	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
40a	3-OCOCH ₃	H	H	H	H	0.170	0.320	3.3	0.130	1.4	1.5	2.4	6.1
43	3-(isoxazol-5-carboxylat)	H	R ₁	R ₁	H	0.058	0.280	3.7	0.025	3.1	0.62	1.2	1.8
50a	H	Br	H	H	CH ₃	0.023	0.025	7.1	< 30	0.110	0.110	0.110	0.120
54	H	H	H	H	Br	0.110	0.110	2.8	0.029	1.9	1.3	1.8	3.9
60	H	-	-	-	-	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
61	CH ₃	-	-	-	-	0.8	> 10	> 10	≥ 10	> 10	> 10	> 10	> 10

Tabelle 50: Darstellung des Selektivitätsprofils der 3-Phenyl-6,7-dihydropyrrolo[3,4-*g*]indol-8(1*H*)-one, sowie der 1-Oxo-1,2,3,6,7,8,9,10-octahydropyrrolo[3,4-*a*]carbazol-7-carbonsäure **60** und dessen Methyramid **61** an Hand der IC₅₀-Werte [μM] für verschiedene CMGC-Kinasen.

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	CDK1	CDK2/A	CDK5	CDK9/ cyclin T	CK1	GSK3
17a	H	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17b	3,4-Cl	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17c	3-Cl	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17d	4-Cl	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17e	3-CH ₃	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17f	H	H	H	H	CH ₃	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17g	H	H	H	H	C ₂ H ₅	> 10	> 10	> 10	> 10	6.1	> 10
17h	H	H	CH ₃	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17i	3-OCH ₃	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17j	3-NO ₃	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17k	2-Cl	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
17l	3-OH	H	H	H	H	> 10	> 10	> 10	1.1	> 10	> 10
21a	H	Br	H	H	H	2.8	> 10	5.3	> 10	1.7	> 10
21b	H	Cl	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
21c	H	Phe	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
21d	H	2-F- Phe	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
21e	H	3-F-	H	H	H	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10



19a-f, 19p, 58a-b

[illegible]

11 Literaturverzeichnis

- ¹ Klebe, G., *Wirkstoffdesign. Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. 2. Auflage, **2009**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 9-21.
- ² Montes, M., Becerra, S., Sanchez-Alvarez, M., Sune, C., *Functional coupling of transcription and splicing*. *Gene* **2012**, 501, 104-117.
- ³ Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., Blencowe, B.J., *Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing*. *Nat. Genet.* **2008**, 40, 1413-1415.
- ⁴ Izquierdo, J.M., Valcarcel, J., *A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing*. *Genes Dev.* **2006**, 20, 1679-1684.
- ⁵ Zhou, Z., Fu, X.D., *Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases*. *Chromosoma* **2013**, 122, 191-207.
- ⁶ Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T.A., Soreq, H., *Function of alternative splicing*. *Gene* **2005**, 344, 1-20.
- ⁷ Luo, M.H., Tse, S.W., Memmott, J., Andreadis, A., *Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain*. *J. Neurochem.* **2004**, 90, 340-351.
- ⁸ Nayler, O., Schnorrer, F., Stamm, S., Ullrich, A., *The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation*. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 34341-34348.
- ⁹ Bullock, A.N., Das, S., Debreczeni, J.E., Rellos, P., Fedorov, O., Niesen, F.H., Guo, K., Papagrigoriou, E., Amos, A.L., Cho, S., Turk, B.E., Ghosh, G., Knapp, S., *Kinase domain insertions define distinct roles of CLK kinases in SR protein phosphorylation*. *Structure* **2009**, 17, 352-362.
- ¹⁰ Yun, B., Farkas, R., Lee, K., Rabinow, L., *The Doa locus encodes a member of a new protein kinase family and is essential for eye and embryonic development in Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **1994**, 8, 1160-1173.
- ¹¹ Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., Angiolini, M., *Through the "gatekeeper door": exploiting the active kinase conformation*. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2681-2694.
- ¹² Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B.J., Lydon, N.B., *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative*. *Cancer Res.* **1996**, 56, 100-104.
- ¹³ Glatz, D.C., Rujescu, D., Tang, Y., Berendt, F.J., Hartmann, A.M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Hulette, C., Jellinger, K., Hampel, H., Riederer, P., Moller, H.J., Andreadis, A., Henkel, K., Stamm, S., *The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease*. *J. Neurochem.* **2006**, 96, 635-644.
- ¹⁴ Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., Spector, D.L., *Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo*. *J. Cell Biol.* **1998**, 143, 297-307.
- ¹⁵ Hartmann, A.M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert, M., Mandelkow, E.M., Gao, Q.S., Andreadis, A., Stamm, S., *Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors*. *Mol. Cell Neurosci.* **2001**, 18, 80-90.
- ¹⁶ Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D., Valcarcel, J., *Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition*. *Mol. Cell* **2005**, 19, 475-484.

- ¹⁷ Casey, R.C., Burleson, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema, T.R., Jr., Ruff, L.E., Skubitz, A.P., *Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids*. Am. J. Pathol. **2001**, 159, 2071-2080.
- ¹⁸ Sodek, K.L., Ringuette, M.J., Brown, T.J., *Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype*. Int. J. Cancer **2009**, 124, 2060-2070.
- ¹⁹ Liu, Y., Conaway, L., Rutherford Bethard, J., Al-Ayoubi, A.M., Thompson Bradley, A., Zheng, H., Weed, S.A., Eblen, S.T., *Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SPF45) by CLK1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion*. Nucleic Acids Res. **2013**, 41, 4949-4962.
- ²⁰ Agarwal, S., Kern, S., Halbert, J., Przyborski, J.M., Baumeister, S., Dandekar, T., Doerig, C., Pradel, G., *Two nucleus-localized CDK-like kinases with crucial roles for malaria parasite erythrocytic replication are involved in phosphorylation of splicing factor*. J. Cell. Biochem. **2011**, 112, 1295-1310.
- ²¹ Ashley, E.A., Dhorda, M., Fairhurst, R.M., Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S., Sreng, S., Anderson, J.M., Mao, S., Sam, B., Sopha, C., Chuor, C.M., Nguon, C., Sovannaroeth, S., Pukrittayakamee, S., Jittamala, P., Chotivanich, K., Chutasmit, K., Suchatsoonthorn, C., Runchaoren, R., Hien, T.T., Thuy-Nhien, N.T., Thanh, N.V., Phu, N.H., Htut, Y., Han, K.T., Aye, K.H., Mokuolu, O.A., Olaosebikan, R.R., Folaranmi, O.O., Mayxay, M., Khanthavong, M., Hongvanthong, B., Newton, P.N., Onyamboko, M.A., Fanello, C.I., Tshefu, A.K., Mishra, N., Valecha, N., Phyo, A.P., Nosten, F., Yi, P., Tripura, R., Borrmann, S., Bashraheil, M., Peshu, J., Faiz, M.A., Ghose, A., Hossain, M.A., Samad, R., Rahman, M.R., Hasan, M.M., Islam, A., Miotto, O., Amato, R., MacInnis, B., Stalker, J., Kwiatkowski, D.P., Bozdech, Z., Jeeyapant, A., Cheah, P.Y., Sakulthaew, T., Chalk, J., Intharabut, B., Silamut, K., Lee, S.J., Vihokhern, B., Kunasol, C., Imwong, M., Tarning, J., Taylor, W.J., Yeung, S., Woodrow, C.J., Flegg, J.A., Das, D., Smith, J., Venkatesan, M., Plowe, C.V., Stepniewska, K., Guerin, P.J., Dondorp, A.M., Day, N.P., White, N.J., *Spread of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N. Engl. J. Med. **2014**, 371, 411-423.
- ²² Trape, J.F., Tall, A., Sokhna, C., Ly, A.B., Diagne, N., Ndiath, O., Mazenot, C., Richard, V., Badiane, A., Dieye-Ba, F., Faye, J., Ndiaye, G., Diene Sarr, F., Roucher, C., Bouganali, C., Bassene, H., Toure-Balde, A., Roussilhon, C., Perraut, R., Spiegel, A., Sarthou, J.L., da Silva, L.P., Mercereau-Puijalon, O., Druilhe, P., Rogier, C., *The rise and fall of malaria in a West African rural community, Dielmo, Senegal, from 1990 to 2012: a 22 year longitudinal study*. Lancet Infect. Dis. **2014**, 14, 476-488.
- ²³ Zhao, S., Chen, D., Geng, Q., Wang, Z., *The highly conserved LAMMER/CLK2 protein kinases prevent germ cell overproliferation in Drosophila*. Dev. Biol. **2013**, 376, 163-170.
- ²⁴ Li, P., Carter, G., Romero, J., Gower, K.M., Watson, J., Patel, N.A., Cooper, D.R., *CLK/STY (cdc2-like kinase 1) and Akt regulate alternative splicing and adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes*. PLoS One **2013**, 8, e53268.
- ²⁵ Kang, W.H., Park, Y.H., Park, H.M., *The LAMMER kinase homolog, LKH1, regulates Tup transcriptional repressors through phosphorylation in Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. **2010**, 285, 13797-13806.
- ²⁶ Muraki, M., Ohkawara, B., Hosoya, T., Onogi, H., Koizumi, J., Koizumi, T., Sumi, K., Yomoda, J., Murray, M.V., Kimura, H., Furuichi, K., Shibuya, H., Krainer, A.R., Suzuki, M., Hagiwara, M., *Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of CLKs*. J. Biol. Chem. **2004**, 279, 24246-24254.

- ²⁷ Mott, B.T., Tanega, C., Shen, M., Maloney, D.J., Shinn, P., Leister, W., Marugan, J.J., Inglese, J., Austin, C.P., Misteli, T., Auld, D.S., Thomas, C.J., *Evaluation of substituted 6-arylquinazolin-4-amines as potent and selective inhibitors of cdc2-like kinases (CLK)*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2009**, 19, 6700-6705.
- ²⁸ Rosenthal, A.S., Tanega, C., Shen, M., Mott, B.T., Bougie, J.M., Nguyen, D.T., Misteli, T., Auld, D.S., Maloney, D.J., Thomas, C.J., *Potent and selective small molecule inhibitors of specific isoforms of cdc2-like kinases (CLK) and dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinases (DYRK)*. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2011**, 21, 3152-3158.
- ²⁹ Tahtouh, T., Elkins, J.M., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Burgy, G., Durieu, E., Cochet, C., Schmid, R.S., Lo, D.C., Delhommel, F., Oberholzer, A.E., Pearl, L.H., Carreaux, F., Bazureau, J.P., Knapp, S., Meijer, L., *Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B*. J. Med. Chem. **2012**, 55, 9312-9330.
- ³⁰ Meijer, L., Thunnissen, A.M., White, A.W., Garnier, M., Nikolic, M., Tsai, L.H., Walter, J., Cleverley, K.E., Salinas, P.C., Wu, Y.Z., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Kim, S.H., Pettit, G.R., *Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent*. Chem. Biol. **2000**, 7, 51-63.
- ³¹ Fedorov, O., Huber, K., Eisenreich, A., Filippakopoulos, P., King, O., Bullock, A.N., Szklarczyk, D., Jensen, L.J., Fabbro, D., Trappe, J., Rauch, U., Bracher, F., Knapp, S., *Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing*. Chem. Biol. **2011**, 18, 67-76.
- ³² Soundararajan, M., Roos, A.K., Savitsky, P., Filippakopoulos, P., Kettenbach, A.N., Olsen, J.V., Gerber, S.A., Eswaran, J., Knapp, S., Elkins, J.M., *Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition*. Structure **2013**, 21, 986-996.
- ³³ Wegiel, J., Gong, C.X., Hwang, Y.W., *The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases*. FEBS J. **2011**, 278, 236-245.
- ³⁴ Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N., Hagiwara, M., *Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase DYRK1A*. Nat. Commun. **2010**, 1, 86.
- ³⁵ Leblond, B., Casagrande, A., Desire, L., Foucourt, A., Besson, T., *DYRK1 inhibitors and uses thereof*. WO 2013/026806 A1. **2013**, 101.
- ³⁶ Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Mylonis, I., Georgatsou, E., *Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence*. FEBS J. **2010**, 278, 570-586.
- ³⁷ Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R., Hagiwara, M., *The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs)*. J. Biol. Chem. **1999**, 274, 11125-11131.
- ³⁸ Fukuhara, T., Hosoya, T., Shimizu, S., Sumi, K., Oshiro, T., Yoshinaka, Y., Suzuki, M., Yamamoto, N., Herzenberg, L.A., Hagiwara, M., *Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2006**, 103, 11329-11333.
- ³⁹ Blight, K., J., Norgard, E., A., *HCV Replicon Systems*, in *HCV Replicon Systems*. **2006**, Horizon Bioscience: Norfolk, UK. 311-351.
- ⁴⁰ Karakama, Y., Sakamoto, N., Itsui, Y., Nakagawa, M., Tasaka-Fujita, M., Nishimura-Sakurai, Y., Kakinuma, S., Oooka, M., Azuma, S., Tsuchiya, K., Onogi, H., Hagiwara, M., Watanabe, M., *Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase*. Antimicrob. Agents Chemother. **2010**, 54, 3179-3186.

- ⁴¹ Gammons, M.V., Fedorov, O., Iverson, D., Du, C., Clark, T., Hopkins, C., Hagiwara, M., Dick, A.D., Cox, R., Harper, S.J., Hancox, J.C., Knapp, S., Bates, D.O., *Topical antiangiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative AMD*. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. **2013**, 54, 6052-6062.
- ⁴² Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M., Zarrinkar, P.P., *A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity*. Nat. Biotechnol. **2008**, 26, 127-132.
- ⁴³ Baeyer, A., Emmerling, A., *Reduction des Isatins zu Indigblau*. Chem. Ber. **1870**, 3, 514-517.
- ⁴⁴ Lee, J.Y., Shin, Y.S., Shin, H.J., Kim, G.J., *Production of natural indirubin from indican using non-recombinant Escherichia coli*. Bioresour. Technol. **2011**, 102, 9193-9198.
- ⁴⁵ Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P., Legoy, M.D., *Identification of an indigo precursor from leaves of Isatis tinctoria (woad)*. Phytochemistry **2001**, 58, 897-904.
- ⁴⁶ Ferandin, Y., Bettayeb, K., Kritsanida, M., Lozach, O., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Meijer, L., *3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents*. J. Med. Chem. **2006**, 49, 4638-4649.
- ⁴⁷ Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Nobel, M.E., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G., Meijer, L., *Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases*. Nat. Cell Biol. **1999**, 1, 60-67.
- ⁴⁸ Determann, R., *Proteinkinase-Inhibitoren mit neuartiger chemischer Struktur*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig **2012**, 79.
- ⁴⁹ Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv. Drug Deliv. Rev. **1997**, 23, 3-25.
- ⁵⁰ Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R., *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. J. Mol. Biol. **1997**, 267, 727-748.
- ⁵¹ Lape, M., Elam, C., Paula, S., *Comparison of current docking tools for the simulation of inhibitor binding by the transmembrane domain of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*. Biophys. Chem. **2010**, 150, 88-97.
- ⁵² *The Protein Data Bank*. abgerufen am 22.09.14, www.rcsb.com.
- ⁵³ *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2013**.
- ⁵⁴ Darwin, C., *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. **1859**, John Murray, London
- ⁵⁵ Eldridge, M.D., Murray, C.W., Auton, T.R., Paolini, G.V., Mee, R.P., *Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes*. J. Comput.-Aided Mol. Des. **1997**, 11, 425-445.
- ⁵⁶ Reddy, A., S., Pati, S., P., Kumar, P., P., Pradeep, H., N., Sastry, G., N., *Virtual screening in drug discovery - a computational perspective*. Curr. Protein and Pept. Sci. **2007**, 8, 329-351.
- ⁵⁷ Huang, S.Y., Grinter, S.Z., Zou, X., *Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions*. Phys. Chem. Chem. Phys. **2010**, 12, 12899-12908.
- ⁵⁸ Jeffrey, G.A., *An introduction to hydrogen bonding*. **1997**, Oxford University Press, New York, 12.

- ⁵⁹ Desiraju, G.R., *A bond by any other name*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **2011**, 50, 52-59.
- ⁶⁰ Meyer, E.A., Castellano, R.K., Diederich, F., *Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **2003**, 42, 1210-1250.
- ⁶¹ Li, J.L., Targett, G.A., Baker, D.A., *Primary structure and sexual stage-specific expression of a LAMMER protein kinase of Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol. **2001**, 31, 387-392.
- ⁶² Wilcken, R., Zimmermann, M.O., Lange, A., Joerger, A.C., Boeckler, F.M., *Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology*. J. Med. Chem. **2013**, 56, 1363-1388.
- ⁶³ Robinson, B., *The fischer indole synthesis*. Chem. Rev. **1963**, 63, 373-401.
- ⁶⁴ Gu, W., Wang, S., *Synthesis and antimicrobial activities of novel 1H-dibenzo[a,c]carbazoles from dehydroabietic acid*. Eur. J. Med. Chem. **2010**, 45, 4692-4696.
- ⁶⁵ Nickson, T.E., Roche-Dolson, C.A., *A convenient procedure for the chlorination of deactivated anilines*. Synthesis **1985**, 669-670.
- ⁶⁶ Apparai, R., D., Chen, X., Chilukuri, R., Crew, A., P., Dong, H., Ferraro, C., Foreman, K., Gupta, R., C., *Aminopyrimidin anticancer compounds*. WO 2010/141406 A2. **2010**, 41.
- ⁶⁷ Schultz, C., Link, A., Leost, M., Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Sausville, E.A., Meijer, L., Kunick, C., *Paullones, a series of cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibition, and in vitro antitumor activity*. J. Med. Chem. **1999**, 42, 2909-2919.
- ⁶⁸ Dess, D., B., Martin, J., C., *Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones*. J. Org. Chem. **1983**, 48, 4155-4156.
- ⁶⁹ Frigerio, M., Santagostino, M., Sputore, S., Palmisano, G., *Oxidation of alcohols with o-iodoxybenzoic Acid (IBX) in DMSO: A new insight into an old hypervalent iodine reagent*. J. Org. Chem. **1995**, 60, 7272-7276.
- ⁷⁰ Revelant, G., Dunand, S., Hesse, S., Kirsch, G., *Microwave-assisted synthesis of 5-substituted 2-aminothiophenes starting from arylacetaldehydes*. Synthesis **2011**, 2935-2940.
- ⁷¹ Condorelli, G., G., Motta, A., Pellegrino, G., Cornia, A., Gorini, L., Fragalà, I., L., Sangregorio, C., Sorace, L., *Site-specific anchoring of tetrairon(III) single molecule magnets on functionalized Si(100) surfaces*. Chem. Mater. **2008**, 20, 2405-2411.
- ⁷² Corey, E., J., Suggs, J., W., *Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds*. Tetrahedron Lett. **1975**, 16, 2647-2650.
- ⁷³ Fernandes, R., A., Kumar, P., *PCC-mediated novel oxidation reactions of homobenzylic and homoallylic alcohols*. Tetrahedron Lett. **2003**, 44, 1275-1278.
- ⁷⁴ Anelli, P., L., Biffi, C., Montanari, F., Quici, S., *Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions*. J. Org. Chem. **1987**, 52, 2559-2562.
- ⁷⁵ Kuhn, W., *Method for stabilizing phenylacetaldehyde*. US 6,624,330 B2. **2003**, 2.
- ⁷⁶ Marr, F., Fröhlich, R., Hoppe, D., *Preparation of meso-1,3-diphenylallyllithium (-)-sparteine - its crystal structure and reactions*. Tetrahedron: Asymmetry **2002**, 13, 2587-2592.
- ⁷⁷ Ishihara, T., Yamamoto, A., Ohshima, M., Aiba, N., *Method for stabilizing aliphatic higher aldehyde compounds*. US 4,568,771. **1986**, 2.
- ⁷⁸ Robinson, B., *Recent studies on the Fischer indole synthesis*. Chem. Rev. **1969**, 69, 227-250.
- ⁷⁹ Celebi-Olcum, N., Boal, B.W., Hutters, A.D., Garg, N.K., Houk, K.N., *Why do some Fischer indolizations fail?* J. Am. Chem. Soc. **2011**, 133, 5752-5755.
- ⁸⁰ Teo, P., Wickens, Z.K., Dong, G., Grubbs, R.H., *Efficient and highly aldehyde selective Wacker oxidation*. Org. Lett. **2012**, 14, 3237-3239.

- ⁸¹ Prühs, C., Kunick, C., *Darpones and water-soluble aminobutoxylated darpone derivatives are distinguished by matrix COMPARE analysis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1850-1854.
- ⁸² Hargreaves, R., B., Whittamore, P., R., O., *Chemical Compounds*. WO 01/12187 A2. **2001**, 51.
- ⁸³ Shionoya, M., Hatano, A., Tanaka, K., Shiro, M., *Syntheses of nucleic acid mimics designed for metal-induced strand formation in DNA*. *Tetrahedron* **2002**, 58, 2965-2972.
- ⁸⁴ Bellamy, F., D., Ou, K., *Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium*. *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 839-842.
- ⁸⁵ Reichwald, C., J., *Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig **2008**, 174.
- ⁸⁶ Campos, K.R., Woo, J.C., Lee, S., Tillyer, R.D., *A general synthesis of substituted indoles from cyclic enol ethers and enol lactones*. *Org. Lett.* **2004**, 6, 79-82.
- ⁸⁷ Miyaura, N., Suzuki, A., *Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds*. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- ⁸⁸ Choi, Y.L., Kim, J.K., Choi, S.U., Min, Y.K., Bae, M.A., Kim, B.T., Heo, J.N., *Synthesis of aristolactam analogues and evaluation of their antitumor activity*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3036-3040.
- ⁸⁹ Martin, R., Mathieu, V., Sorokin, V., Bachawala, P., Mazur, W., A., Maunoury, J., *Host material for light-emitting diodes*. WO 2010/043693 A1. **2010**, 27.
- ⁹⁰ Coste, J., Le-Nguyen, D., Castro, B., *PyBOP: A new Peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208.
- ⁹¹ Frérot, E., Coste, J., Pantaloni, A., Dufour, M.-N., Jouin, P., *PyBOP and PyBrop: two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib*. *Tetrahedron* **1991**, 47, 259-270.
- ⁹² Pivonka, D., E., Palmer, D., L., Gero, T., W., *Infrared investigation of acid activation by PyBOP in polystyrene/divinylbenzene supported solid-phase synthesis*. *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 1027-1032.
- ⁹³ Rajagopal, B., Chen, Y.Y., Chen, C.C., Liu, X.Y., Wang, H.R., Lin, P.C., *Cu(I)-catalyzed synthesis of dihydropyrimidin-4-ones toward the preparation of beta- and beta3-amino acid analogues*. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 1254-1264.
- ⁹⁴ Stuhlmann, F., Jäger, T., Flohé, F., Schinzer, D., *N⁵-substituted benzo-2,3-azepino-[4,5-b]indol-6-ones for treating tropical diseases*. EP 1757607 A1. **2007**, 20.
- ⁹⁵ Bailey, D.M., DeGrazia, G.D., Alexander, E.J., Powles, R.G., Johnson, R.E., Patrick, R.A., Heerdt, B.G., Fairbain, M.E., Pruden, D.J., *Syntheses and complement inhibitory activities of 4-(2-phenyl-1H-indol-3-yl)cyclohexane-1-carboxylic acids*. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 160-164.
- ⁹⁶ Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S., Coleman, R.G., *ZINC: A free tool to discover chemistry for biology*. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 1757-1768.
- ⁹⁷ Weininger, D., *SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules*. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, 28, 31-36.
- ⁹⁸ *Pipeline Pilot, 9.0*; Accelrys Inc., 5005 Wateridge Vista Drive, San Diego, CA 92121, USA, **2013**.
- ⁹⁹ Rogers, D., Hahn, M., *Extended-connectivity fingerprints*. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 742-754.
- ¹⁰⁰ Gardiner, E.J., Holliday, J.D., O'Dowd, C., Willett, P., *Effectiveness of 2D fingerprints for scaffold hopping*. *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 405-414.

- ¹⁰¹ Willett, P., *Searching techniques for databases of two- and three-dimensional chemical structures*. J. Med. Chem. **2005**, 48, 4183-4199.
- ¹⁰² Willett, P., *Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints*. Drug Discov. Today **2006**, 11, 1046-1053.
- ¹⁰³ Wermuth, C.G., Ganellin, C., R., Lindberg, P., Mitscher, L., A., *Glossary of terms used in medicinal chemistry*. Pure Appl. Chem. **1998**, 70, 1129-1143.
- ¹⁰⁴ Nicklaus, M.C., Wang, S., Driscoll, J.S., Milne, G.W., *Conformational changes of small molecules binding to proteins*. Bioorg. Med. Chem. **1995**, 3, 411-428.
- ¹⁰⁵ Chen, I.J., Foloppe, N., *Conformational sampling of druglike molecules with MOE and catalyst: implications for pharmacophore modeling and virtual screening*. J. Chem. Inf. Model. **2008**, 48, 1773-1791.
- ¹⁰⁶ Ferguson, D., M., Raber, D., J., *A new approach to probing conformational space with molecular mechanics: random incremental pulse search*. J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111, 4371-4378.
- ¹⁰⁷ Bento, A.P., Gaulton, A., Hersey, A., Bellis, L.J., Chambers, J., Davies, M., Kruger, F.A., Light, Y., Mak, L., McGlinchey, S., Nowotka, M., Papadatos, G., Santos, R., Overington, J.P., *The ChEMBL bioactivity database: an update*. Nucleic Acids Res. **2014**, 42, D1083-1090.
- ¹⁰⁸ Egert-Schmidt, A.M., Dreher, J., Dunkel, U., Kohfeld, S., Preu, L., Weber, H., Ehlert, J.E., Mutschler, B., Totzke, F., Schachtele, C., Kubbutat, M.H., Baumann, K., Kunick, C., *Identification of 2-anilino-9-methoxy-5,7-dihydro-6H-pyrimido[5,4-d][1]benzazepin-6-ones as dual PLK1/VEGF-R2 kinase inhibitor chemotypes by structure-based lead generation*. J. Med. Chem. **2010**, 53, 2433-2442.
- ¹⁰⁹ Zaharevitz, D.W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A.M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., Sausville, E.A., *Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases*. Cancer Res. **1999**, 59, 2566-2569.
- ¹¹⁰ Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., Sica, F., *An overview of biological macromolecule crystallization*. Int. J. Mol. Sci. **2013**, 14, 11643-11691.
- ¹¹¹ Allinger, N. L., *MM2. A hydrocarbon force field utilizing V_1 and V_2 torsional terms*. J. Am. Chem. Soc. **1977**, 99, 8127-8134.
- ¹¹² Bertrand, J.A., Thieffine, S., Vulpetti, A., Cristiani, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H.M., Flocco, M., *Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors*. J. Mol. Biol. **2003**, 333, 393-407.
- ¹¹³ Vedadi, M., Niesen, F.H., Allali-Hassani, A., Fedorov, O.Y., Finerty, P.J., Jr., Wasney, G.A., Yeung, R., Arrowsmith, C., Ball, L.J., Berglund, H., Hui, R., Marsden, B.D., Nordlund, P., Sundstrom, M., Weigelt, J., Edwards, A.M., *Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination*. Proc. Natl. Acad. Sci U S A **2006**, 103, 15835-15840.
- ¹¹⁴ Armarego, W.L.F., Chai, C.L.L., *Purification of laboratory chemicals*. **2003**, MPG Books, Bodwin, Cornwall, USA
- ¹¹⁵ Garcia-Echeverria, C., Kanazawa, T., Kawahara, E., Masuya, K., Matsuura, N., Miyake, T., Ohmori, O., Umemura, I., *2,4-Di(phenylamino)pyrimidines useful in the treatment of neoplastic diseases, inflammatory and immune system disorders*. WO 2004/080980 A1. **2004**, 59.
- ¹¹⁶ Ozaki, F., Ishibashi, K., Ikuta, H., Ishihara, H., Souda, S., *Anthranilic acid derivative*. WO95/18097 A1. **1995**, 56.
- ¹¹⁷ Ji, H., Li, H., Martasek, P., Roman, L.J., Poulos, T.L., Silverman, R.B., *Discovery of highly potent and selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase by fragment hopping*. J. Med. Chem. **2009**, 52, 779-797.

- ¹¹⁸ Miao, Z., Liu, J., *Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides*. WO2008/077079 A1. **2008**,
- ¹¹⁹ Irwin, J. *ZINC database*. abgerufen: Juli 2013. <http://zinc.docking.org/subsets/all-purchasable>.
- ¹²⁰ *The PyMOL Molecular Graphics System*, 1.7.1.1; Schrödinger, LLC., **2009-2014**.
- ¹²¹ Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli*. J. Bacteriol. **1951**, 62, 293-300.
- ¹²² Leslie, A., G., W., Powell, H., R., *Evolving methods for macromolecular crystallography*. Band 245, **2007**, Springer Dordrecht, Niederlande, 41-51.
- ¹²³ Evans, P.R., Murshudov, G.N., *How good are my data and what is the resolution?* Acta Cryst. **2013**, 69, 1204-1214.
- ¹²⁴ McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., *Phaser crystallographic software*. J. Appl. Crystallogr. **2007**, 40, 658-674.
- ¹²⁵ Skubak, P., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., *Direct incorporation of experimental phase information in model refinement*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. **2004**, 60, 2196-2201.
- ¹²⁶ Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. **2010**, 66, 486-501.
- ¹²⁷ Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S., *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. **2011**, 67, 235-242.
- ¹²⁸ Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. **2010**, 66, 12-21.
- ¹²⁹ Falke, H., Chaikuad, A., Becker, A., Loaec, N., Lozach, O., Abu Jhaisha, S., Becker, W., Jones, P.G., Preu, L., Baumann, K., Knapp, S., Meijer, L., Kunick, C., *10-Iodo-11H-indolo[3,2-c]quinoline-6-carboxylic acids are selective inhibitors of DYRK1A*. J. Med. Chem. **2015**, 58, 3131-3143.
- ¹³⁰ Beauchard, A., Laborie, H., Rouillard, H., Lozach, O., Ferandin, Y., Le Guevel, R., Guguen-Guillouzo, C., Meijer, L., Besson, T., Thiery, V., *Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids*. Bioorg. Med. Chem. **2009**, 17, 6257-6263.
- ¹³¹ Bettayeb, K., Sallam, H., Ferandin, Y., Popowycz, F., Fournet, G., Hassan, M., Echaliier, A., Bernard, P., Endicott, J., Joseph, B., Meijer, L., *N-&N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine*. Mol. Cancer. Ther. **2008**, 7, 2713-2724.
- ¹³² Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P., *Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases CDC2, CDK2 and CDK5*. Eur. J. Biochem. **1997**, 243, 527-536.
- ¹³³ Primot, A., Baratte, B., Gompel, M., Borgne, A., Liabeuf, S., Romette, J.L., Jho, E.H., Costantini, F., Meijer, L., *Purification of GSK-3 by affinity chromatography on immobilized axin*. Protein Expr. Purif. **2000**, 20, 394-404.
- ¹³⁴ Droucheau, E., Primot, A., Thomas, V., Mattei, D., Knockaert, M., Richardson, C., Sallicandro, P., Alano, P., Jafarshad, A., Baratte, B., Kunick, C., Parzy, D., Pearl, L., Doerig,

C., Meijer, L., *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1697, 181-196.

- ¹³⁵ Debdab, M., Carreaux, F., Renault, S., Soundararajan, M., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Lozach, O., Babault, L., Tahtouh, T., Baratte, B., Ogawa, Y., Hagiwara, M., Eisenreich, A., Rauch, U., Knapp, S., Meijer, L., Bazureau, J.P., *Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing*. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4172-4186.

Danksagung

Für die Testung der Kinaseinhibition möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Meijer (ManRos, Therapeutics, Roscoff, Frankreich) sowie bei seinen Mitarbeiterinnen Frau N. Loaëc und Frau E. Durieu bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. S. Knapp (Nuffield Department of Clinical Medicine, Structural Genomics Consortium, University of Oxford, Großbritannien) dafür, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die Technik der Proteinkristallographie erlernen und Kristallstrukturen anfertigen konnte. Für die geduldige und qualifizierte Anleitung in der praktischen und theoretischen Arbeit möchte ich außerdem seinem Mitarbeiter Herrn Dr. A. Chaikuad danken.

Für die Ermöglichung der Durchführung eines virtuellen Screenings in der chemischen Biologie der TU Dortmund sowie für seine freundliche und engagierte Betreuung danke ich Herrn Dr. O. Koch sehr herzlich.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen der NMR-Abteilung des Instituts für Organische Chemie der TU Braunschweig, Frau Dr. K. Ibrom und Frau P. Holba-Schulz, für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren. Desweiteren danke ich Herrn Dr. U. Papke und Frau C. Mlynek der Massenspektrometrie-Abteilung der Chemischen Institute der TU Braunschweig für die Durchführung massenspektrometrischer Untersuchungen. Herrn Prof. Dr. P. G. Jones und seinen Mitarbeitern aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig danke ich für die Anfertigung der Röntgenkristallstruktur-Analysen kleiner organischer Moleküle.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Lutz Preu für seine stete Unterstützung, seinen Rat und die zahlreichen angenehmen Gespräche, sowohl fachlicher als auch überfachlicher Natur, danken.

Ich danke im Besonderen den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau S. Meyer und Frau P. Reich für die Anfertigung der FT-IR-Spektren, der Elementaranalysen sowie für die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig danke ich für die Versorgung mit Chemikalien

und Glasgeräten, ihre zeitnahe technische Unterstützung und die zahlreichen interessanten Gespräche.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Arbeitskreises Herrn H. Falke, Frau R. Helmer, Frau R. Korn, Frau F. Maiwald, Frau J. Ryczak, Herrn S. Wölfel, Herrn M. Immer, Herrn D. H. Lande, Herrn A. Masch, Frau R. Meine, Herrn O. Orban, Frau L. Schlütke, Herrn T. Weidner. Außerdem möchte ich mich besonders bei den ehemaligen und aktuellen Kollegen in der Betreuung des 8. Fachsemesters Frau H. Burmeister, Herrn M. Immer, Herrn F. Kölling, Frau J. Krause, Herrn D. H. Lande, Frau S. Lucka, Herrn Dr. Lutz Preu, Frau S. Redweik, Frau J. Ryczak für die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Schließlich möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie und bei Chris für ihre beständige Ermutigung und Unterstützung bedanken, durch die alle Hindernisse für mich überwindbar wurden.